

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE *STREPTOCOCCUS SUIS* SÉROTYPE 2
ET DES CELLULES ENDOTHÉLIALES PORCINES

par

GHYSLAINE VANIER

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

Janvier, 2008

©Ghyslaine Vanier, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE *STREPTOCOCCUS SUI* SÉROTYPE 2
ET DES CELLULES ENDOTHÉLIALES PORCINES**

présentée par :

GHYSLAINE VANIER

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Josée Harel
présidente-rapporteuse

Marcelo Gottschalk
directeur de recherche

Mariela Segura
codirectrice

Jean-Pierre Lavoie
membre du jury

Fatiha Chandad
examinatrice externe

Mario Jacques
représentant du doyen de la FESP

RÉSUMÉ

Streptococcus suis est un pathogène porcin majeur causant majoritairement la méningite. Il est aussi considéré comme un agent zoonotique émergent. La pathogenèse de l'infection à *S. suis* ainsi que ses facteurs de virulence n'ont pas été complètement définis. Cependant, pour atteindre le système nerveux central et causer la méningite, *S. suis* doit traverser la barrière hémato-méningée (BBB) formée par les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (BMEC). L'objectif principal de ce projet était d'étudier cette étape clé de la pathogenèse en examinant les interactions entre *S. suis* et des BMEC porcines immortalisées (PBMEC) constituant la BBB.

Nous avons démontré que *S. suis* adhère et envahit et survit à l'intérieur des PBMEC. Les souches de sérotype 2 sont capables d'interagir avec les PBMEC, mais cette capacité n'est pas corrélée avec leur origine géographique, leur virulence, leur hôte d'origine, ni leur capacité à produire la suilysine. Des études d'inhibition ont démontré que les microfilaments d'actine, mais pas les éléments microtubulaires du cytosquelette sont impliqués dans l'invasion et que cette dernière ne requiert pas la synthèse active d'ARN ou de protéines bactériennes. Des études de caractérisation ont démontré que des adhésines/invasines de nature protéique, des composantes de la paroi cellulaire, l'acide lipoteichoïque et des composantes du sérum (incluant la fibronectine) étaient impliqués dans les interactions entre *S. suis* et les PBMEC. Cependant, les polysaccharides capsulaires ont semblé interférer avec ces interactions. Nous avons démontré que la suilysine est cytotoxique pour les PBMEC par l'utilisation de suilysine purifiée, d'un mutant suilysine-négatif et de fortes concentrations de souches la produisant. Nous avons également étudié l'habileté de *S. suis* à induire la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les PBMEC et nous avons démontré que la bactérie induit une forte sécrétion d'interleukine (IL)-6 et d'IL-8. En utilisant plusieurs composantes purifiées et plusieurs souches, nous avons démontré que la suilysine (à des doses non-toxiques) était largement responsable de cette stimulation et que la paroi cellulaire induisait aussi cette stimulation mais à un niveau moindre. La production d'IL-8 est devenue indétectable lorsque les PBMEC étaient mises en contact avec certaines souches de *S. suis*. Cet effet était dépendant de la concentration de bactéries vivantes et du temps et nous avons démontré qu'il était inhibé en présence d'inhibiteurs de protéases. La dégradation d'IL-8 en présence de surnageant de *S. suis* a aussi été visualisée par coloration au nitrate d'argent d'un gel d'électrophorèse et par immunobuvardage. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'IL-8 serait dégradée par une sérine protéase sécrétée par *S. suis*.

Chez d'autres bactéries à Gram positif, plusieurs protéines de surface possédant un motif Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) sont connues pour jouer des rôles importants dans la virulence. Ces protéines spécifiques sont ancrées de façon covalente dans la paroi cellulaire par la sortase A. En utilisant un mutant interrompu pour le gène de la sortase A, nous avons montré que ce mutant avait une capacité réduite à adhérer et à envahir les PBMEC et qu'il adhérait moins bien aux protéines de la matrice extracellulaire. Cependant, l'interruption du gène de la sortase A a eu peu d'effet sur la virulence de *S. suis* chez la souris.

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs de virulence potentiels, une banque de mutants, produite par une simple insertion du transposon Tn917, a été criblée et les sites d'insertion du transposon chez les mutants moins invasifs chez les PBMEC ont été séquencés et caractérisés. Deux mutants, se sont avérés moins virulents tel qu'indiqué par une colonisation des organes plus faible, ainsi que par une mortalité et une morbidité réduites chez la souris. Chez le premier mutant, l'insertion s'est produite dans un gène homologue à un gène codant pour une protéine possédant un motif d'ancrage LPXTG dans la paroi cellulaire et se trouvant dans une région similaire à celle codant pour les protéines formant un pilus chez d'autres *Streptococcus*. Chez le second mutant, un gène similaire à un gène codant pour une composante ATPase d'un système de transport de type ABC a été interrompu. Chez le porc, ces deux mutants ont causé des signes cliniques moins sévères et retardés, des niveaux plasmatiques plus faibles d'IL-6 et une charge bactérienne moins élevée dans le sang.

La transmigration à travers la BBB est une étape clé de la méningite porcine causée par *S. suis*. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que *S. suis* utilise plusieurs mécanismes pour traverser cette barrière. Ainsi, en plus d'adhérer, d'envahir, de survivre à l'intérieur des cellules endothéliales de la BBB, *S. suis* est également capable d'induire une forte réponse inflammatoire chez ces cellules. Plusieurs composantes bactériennes sont impliquées dans ces interactions comme la suilysine, les composantes de la paroi cellulaire, des protéines LPXTG ainsi que diverses protéines et enzymes impliquées entre autres dans le transport.

Mots clés : adhésion, cellules endothéliales, cytotoxicité, induction de cytokines, invasion, méningite, pilus, sortase, *Streptococcus suis*, suilysine

SUMMARY

Streptococcus suis is a major swine pathogen causing mainly meningitis. It is also considered as an emerging zoonotic agent. The pathogenesis of *S. suis* infection and virulence factors involved in this process have not been completely defined. In order to reach the central nervous system and to cause meningitis, *S. suis* has to cross the blood-brain barrier (BBB) constituted by brain microvascular endothelial cells (BMEC). The main objective of this work was to study this key step by evaluating the interactions of *S. suis* with immortalized porcine BMEC (PBMEC) forming the BBB.

We demonstrated that *S. suis* adheres to, invades and survives inside PBMEC. Serotype 2 strains are able to interact with PBMEC, but this ability was not found to correlate with their geographic origin, virulence, host of origin, or suilysin production. Inhibitory studies demonstrated that actin microfilaments but not microtubular cytoskeletal elements were involved in PBMEC invasion. Moreover, this invasion does not require active bacterial RNA or protein synthesis. Characterization studies demonstrated that proteinaceous adhesins/invasins, cell wall components, lipoteichoic acid, and serum components (including fibronectin) were involved in the interactions between *S. suis* and PBMEC. However, the capsular polysaccharides seemed to interfere with the adhesion and invasion abilities of *S. suis*. We demonstrated that suilysin is toxic against PBMEC by using purified suilysin, a suilysin-negative mutant and high bacterial doses of suilysin-positive strains. We also investigated the ability of *S. suis* to induce the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines by PBMEC and we demonstrated that *S. suis* induced a strong release of interleukin (IL)-6 and IL-8. Using various purified components and strains, we showed that the suilysin (sub-toxic doses) was largely responsible for such stimulation. The cell wall also induced cell stimulation but to a lower extent. Interestingly, in the presence of some strains, IL-8 production by PBMEC became undetectable. This effect was time- and live bacteria concentration-dependent and we demonstrated that it was inhibited in presence of protease inhibitors. Also, the degradation of IL-8 by *S. suis* supernatant was visualized by silver staining of an electrophoresis gel and by Western blot. Our results suggest that porcine IL-8 would be degraded by a secreted serine protease produced by *S. suis*.

In other Gram positive bacteria, many cell surface proteins possessing a Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) motif were reported to play important roles in virulence. These specific proteins are covalently anchored to the cell wall by sortase A. Using a mutant strain lacking the sortase A gene, we showed that this mutant had reduced capacity to adhere to

and invade PBMEC, and was less adherent to extracellular matrix proteins. However, disruption of sortase A gene had little effect on the virulence in mouse.

In our efforts to identify new putative virulence factors of *S. suis* a mutant library, produced by a single insertion of transposon Tn917 in *S. suis*, was screened and insertion sites from low invasive mutants with PBMEC were sequenced and characterized. Two mutants were less virulent as indicated by decreased colonization of organs, as well as reduced mortality and morbidity in mice. In a first mutant, the insertion site was found in a gene homologous to a gene coding for a protein possessing a LPXTG-motif cell wall anchor domain and this gene was located in a region similar to a streptococcal pilus coding region. In the second mutant, a gene similar to a gene coding for an ATPase component from an ABC-type multidrug transport system has been interrupted. In swine, decreased bacterial loads in blood, less severe and delayed clinical signs, as well as lower IL-6 levels in plasma were observed for these two mutants.

The transversal of the BBB is a key step in swine meningitis caused by *S. suis*. Overall, our results suggest that *S. suis* uses several mechanisms to cross this anatomical barrier. Thus, in addition to adhere, to invade and to survive inside endothelial cells forming the BBB, *S. suis* is also able to induce a strong inflammatory response from these cells. Several bacterial components are involved in these interactions such as suilysin, cell wall components, and LPXTG proteins as well as different proteins and enzymes involved, among other, in transport.

Keywords : *adhesion, cytotoxicity, endothelial cells, induction of cytokines, invasion, meningitis, pilus, sortase, Streptococcus suis, suilysin.*

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xv
DÉDICACE	xvii
REMERCIEMENTS.....	xviii
 I. INTRODUCTION	 1
 II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	 4
1. <i>Streptococcus suis</i>	5
1.1. Aspects généraux de <i>S. suis</i>	5
1.2. Les sérotypes.....	5
1.3. Infection et transmission de <i>S. suis</i>	7
1.3.1. Chez le porc.....	7
1.3.2. Chez l'humain	8
1.3.2.1. Épidémie humaine en Chine	10
1.3.3. Chez d'autres espèces animales.....	12
1.4. Traitement et prévention de l'infection	12
1.4.1. Chez le porc	12
1.4.2. Chez l'humain	14
1.5. Les facteurs de virulence proposés de <i>S. suis</i>	14
1.5.1. Capsule polysaccharidique.....	15
1.5.2. OFS	15
1.5.3. MRP et EF.....	15
1.5.4. Suilysine.....	16
1.5.5. Adhésines.....	18
1.5.5.1. FBPS.....	18
1.5.5.2. GAPDH.....	18
1.5.5.3. Alpha-énolase	19
1.5.5.4. Hémagglutinines	19
1.5.6. Protéases	20
1.5.7. Autres protéines associées à la pathogenèse de l'infection ou à la virulence	22
1.5.7.1. Fimbriae	22
1.5.7.2. Protéine Sao	22
1.5.7.3. Glutamate déshydrogénase	22
1.5.7.4. Proliprotéine signal peptidase	22
1.5.7.5. Protéine inconnue de 38 kDa	23
1.5.7.6. Nucléase SsnA	23
1.5.7.7. Protéine membranaire de 44 kDa	24
1.5.7.8. Activité superoxide dismutase	24
1.5.7.9. Protéines du système arginine déiminase	24

1.5.7.10. Sortases	25
1.5.7.11. Protéines liant des protéines de la matrice extracellulaire	25
1.6. La pathogenèse de l'infection causée par <i>S. suis</i>	26
1.6.1. Voies d'entrée possibles dans le sang et dissémination dans l'organisme	26
1.6.1.1. Interactions avec des cellules d'amygdales palatines.....	27
1.6.1.2. Interactions avec des cellules épithéliales ..	27
1.6.1.3. Interactions avec des cellules phagocytaires	29
1.6.1.3.1. Récepteur impliqué dans la stimulation des cellules phagocytaires et la cascade signalétique subséquente	31
1.6.1.4. Interactions avec des cellules endothéliales	32
1.6.2. Voies d'entrée possibles dans le SNC (BBB).....	32
1.6.2.1. Interactions avec des cellules endothéliales de la BBB.....	32
1.6.2.2. Cellules épithéliales porcines du plexus choroïde de la barrière sang-CSF.....	34
1.6.2.3. La théorie du cheval de Troie et la théorie modifiée	35
2. Barrière hémato-méningée	36
2.1. Jonctions serrées	38
2.2. En conditions d'inflammation	40
3. Mécanismes de transmigration à travers la BBB	41
4. Les pathogènes traversant la BBB	42
4.1. <i>Escherichia coli</i> K1	42
4.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	43
4.3. Streptocoque du groupe B	44
4.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.5. <i>Borrelia burgdorferi</i>	46
4.6. <i>Citrobacter freundii</i>	46
4.7. <i>Haemophilus parasuis</i>	46
4.8. <i>Haemophilus influenzae</i>	47
4.9. <i>Neisseria meningitidis</i>	47
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	49
Article I: Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by <i>Streptococcus suis</i> serotype 2. 2004. Infect Immun. 72:1441- 1449.....	50

Article II: Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by <i>Streptococcus suis</i> serotype 2. 2007. Can J Vet Res. 71(2): 81-89	77
Article III: Porcine Brain Microvascular Endothelial Cell-derived Interleukin-8 is first induced and then degraded by <i>Streptococcus suis</i> , <i>manuscrit en préparation</i>	97
Article IV: Disruption of <i>srtA</i> gene in <i>Streptococcus suis</i> results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. 2008. Vet Micro. 127 (3-4): 417-424	128
Article V: New putative virulence factors of <i>Streptococcus suis</i> involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells, Microb Pathog, <i>manuscrit soumis</i>	144
IV. DISCUSSION	167
1. Étude et caractérisation de l'adhérence et l'invasion des cellules endothéliales porcines par <i>S. suis</i> sérotype 2	167
2. Conséquences des interactions entre <i>S. suis</i> et les cellules endothéliales porcines de la BBB	177
2.1. Effets cytotoxiques	177
2.2. Stimulation de la réponse inflammatoire	178
3. Identification de facteurs de virulence potentiels impliqués dans l'invasion des PBMEC	184
V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	193
VI. RÉFÉRENCES	197
VII. ANNEXES	xix
Article VI : Use of selective capture of transcribed sequences to identity genes preferentially expressed by <i>Streptococcus suis</i> upon interaction with porcine brain endothelial cells. 2007. App. Environ. Microbiol. 73 (13) : 4359-64	xx
Article VII: <i>Haemophilus parasuis</i> invades porcine brain microvascular endothelial cells. 2006. Microbiology. 152 (Pt 1) : 135-145	xxvi

LISTE DES TABLEAUX

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I: Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2

Tableau 1.	Cytotoxicity of different <i>S. suis</i> serotype 2 strains to PBMEC as determined by measurement of LDH release	59
------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Article II: Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2

Tableau 1.	Capacities of strains of <i>Streptococcus suis</i> to adhere to and invade porcine brain microvascular endothelial cells	85
------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Article III: Porcine Brain Microvascular Endothelial Cell-derived Interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*

Tableau 1.	<i>Streptococcus suis</i> strains used in this study	102
------------	------------------------------------------------------------	-----

Article V: New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells

Tableau 1.	Genes identified from less invasive <i>S. suis</i> Tn917-insertional mutants with PBMEC	148
Tableau 2.	Virulence of <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7 and five Tn917-insertional mutants in CD1 mice	151

DISCUSSION

Tableau 1.	Gènes interrompus par l'insertion du transposon Tn917 chez les mutants de <i>S. suis</i> moins invasifs avec les PBMEC	190
------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ANNEXES

Article VI : Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain endothelial cells

Tableau 1.	Oligonucleotide primers used in this study	xxi
Tableau 2.	Genes identified by SCOTS that are differentially expressed by <i>S. suis</i> upon interaction with PBMEC	xxii

Article VII: *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells

Tableau 1.	Strains used in this study	xxvii
------------	----------------------------------	-------

LISTE DES FIGURES

RESCENCION DE LITTÉRATURE

- Figure 1. La barrière hémato-méningée (BBB) 37
- Figure 2. La structure des jonctions serrées 40

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I: Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2.

- Figure 1. (A) Kinetics of cytotoxicity produced by *S. suis* on PBMEC
(B) Effect of *S. suis* concentration on PBMEC injury 60
- Figure 2. Transmission electron micrographs demonstrating PBMEC injury caused by *S. suis* 61
- Figure 3. (A - D) Kinetics of *S. suis* adhesion to PBMEC
(E - H) Kinetics of PBMEC invasion by *S. suis* 63
- Figure 4. Scanning electron micrographs showing *S. suis* interactions with PBMEC 65
- Figure 5. Transmission electron micrographs showing PBMEC invasion by *S. suis* 66
- Figure 6. Intracellular survival of *S. suis* within PBMEC 67
- Figure 7. Inhibition of PBMEC invasion by *S. suis* using cytochalasin D and colchicine 68

Article II: Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2.

- Figure 1. Interactions between PBMECs and *S. suis* according to geographic origin and phenotype (virulent or not) of the *S. suis* strain 85
- Figure 2. Inhibition of invasion of PBMECs by *S. suis* by pretreatment of the bacteria with proteases 87
- Figure 3. Inhibition of invasion of PBMECs by *S. suis* by pretreatment of the PBMEC monolayers with purified *S. faecalis* lipoteichoic acid or purified cell wall 88
- Figure 4. Effect of serum type and concentration on the level of PBMEC invasion by *S. suis* 90
- Figure 5. Interactions of *S. suis* with immortalized PBMECs or primary PBMECs 91
- Figure 6. Interactions of *S. suis* with porcine aortic endothelial cell lines AOC and PAEC₁₁ 92

Article III: Porcine Brain Microvascular Endothelial Cell-derived Interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*.

- Figure 1. (A - B) Kinetics of IL-6 and IL-8 release by PBMEC stimulated by live *S. suis* strain 31533 or positive control *E. coli* O55:B5 LPS. (C - D) Effect of live *S. suis* strain 31533 concentration on IL-6 and IL-8 production by PBMEC 108
- Figure 2. (A - B) Contribution of different bacterial components to IL-6 and IL-8 production by PBMEC stimulated with live *S. suis* strain 31533, nonencapsulated mutant B218, CPS, CW, LTA, suilysin-negative mutant SX911, suilysin, or live *S. suis* strain 31533 in presence of cholesterol. (C - D) Comparative study of IL-6 and IL-8-release by PBMEC stimulated with different live *S. suis* serotype 2 strains 110
- Figure 3. (A) Kinetics of IL-8 release by PBMEC stimulated with live *S. suis* representative serotype 2 strains. (B) Kinetics of IL-8 release by PBMEC stimulated with live, and heat-killed *S. suis* strain NCTC 10234. (C) Effect of live *S. suis* strain NCTC 10234 concentration on IL-8 production by PBMEC after 24 h of incubation..... 113
- Figure 4. Kinetics of IL-8 release by PBMEC stimulated with positive control ultra-purified *E. coli* O55:B5 LPS alone and LPS along with live *S. suis* strain NCTC 10234 115
- Figure 5. Swine recombinant IL-8 degradation following incubation with supernatant from *S. suis* strain NCTC 10234 grown for 16 h, or with supernatant together with complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, aprotinin, or Pefabloc SC 116
- Figure 6. Porcine recombinant IL-8 (~9 KDa) cleavage by supernatant from *S. suis* strain NCTC 10234 after 20h of incubation. (A) Silver stained SDS-PAGE. (B) Western blotting 117

Article IV: Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins.

- Figure 1. (A) Adhesion to PBMEC by mutant SRTΔA compared to the wild-type strain NCTC 10234 (B) Invasion of PBMEC by mutant SRTΔA compared to the wild-type strain NCTC 10234 135
- Figure 2. Binding to different concentrations of plasma fibronectin and collagen type I by mutant SRTΔA compared to the wild-type strain NCTC 10234..... 136

Figure 3.	Kaplan-Meier survival analysis of CD1 mice infected with the wild-type strain NCTC 10234 or the mutant SRTΔA	137
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Article V: New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells

Figure 1.	Bacterial growth of the wild-type strain P1/7 and 5 Tn917 insertion mutants during the 2 h PBMEC invasion period expressed as CFU/ml	149
Figure 2.	Survival curves for CD1 mice infected with the wild-type strain P1/7 and 5 mutants Tn917	150
Figure 3.	(A) Virulence of <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7 and two Tn917-insertional mutants in pigs. (B) Levels of IL-6 in swine plasma from pigs infected with <i>S. suis</i> wild-type strain P1/7 and two Tn917-insertional mutants 24 h post-infection	158

DISCUSSION

Figure 3.	Interactions entre <i>S. suis</i> et les PBMEC	178
Figure 4.	Modèle proposé pour l'inflammation de la BBB causée par <i>S. suis</i> et son passage vers le SNC	184
Figure 5.	Ilot <i>rlrA</i> de <i>S. pneumoniae</i>	187

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Figure 6.	Implication des différentes composantes de <i>S. suis</i> dans les interactions avec les cellules endothéliales de la BBB et dans la survie à l'intérieur de l'hôte.	194
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ANNEXES

Article VI : Use of selective capture of transcribed sequences to identity genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain endothelial cells.

Figure 1.	n-Fold changes in the expression of selected <i>S. suis</i> genes identified by SCOTS as measured by q-PCR upon interaction of the bacterium with PBMEC	xxiii
Figure 2.	Putative pilus island in <i>S. suis</i> and its counterpart, PI-2b, found in <i>S. agalactiae</i> strain COH1	xxiii

Article VII: *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells.

Figure 1.	(A) Kinetics of <i>H. parasuis</i> adhesion to PBMEC (B) Effect of bacterial <i>H. parasuis</i> concentration on level of adhesion to PBMEC	xxix
Figure 2.	(A) Kinetics of PBMEC invasion by <i>H. parasuis</i> (B) Effect of bacterial <i>H. parasuis</i> concentration on level of PBMEC invasion	xxviii
Figure 3.	Scanning and transmission electron microscopy micrographs showing <i>H. parasuis</i> interactions with PBMEC	xxx
Figure 4.	Intracellular survival of <i>H. parasuis</i> within PBMEC	xxx
Figure 5.	Inhibition of invasion of PBMEC by <i>H. parasuis</i> strain Nagasaki with cytochalasin D and colchicine	xxxi

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADS	Système arginine déiminase
AEBSF	4-(2-Aminoéthyl)benzènesulfonyl fluoride hydrochlorique
AOC	Cellules endothéliales d'aorte
BBB	Barrière hémato-méningée
BMEC	Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux
CD	Grappe de différenciation
CFU	Unité formatrice de colonie
CPEC	Cellules épithéliales porcines du plexus choroïde
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique
CPS	Capsule polysaccharidique
CSF	Liquide céphalo-rachidien
DPP IV	Dipeptidyl peptidase IV
EF	Facteur extracellulaire
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FBS	Sérum foetal bovin
FBPS	Protéine liant la fibronectine et le fibrinogène
FN	Fibronectine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAS	Streptocoque du groupe A
GBS	Streptocoque du groupe B
Gbo ₃	Céramide trihexosyl
GDH	Glutamate déshydrogénase
GM-CSF	Facteur stimulateur de colonies de granulocytes et de macrophages
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
HUVEC	Cellules endothéliales humaines de cordon ombilical
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire -1
Ig	Immunoglobuline
JAM	Molécules d'adhésion jonctionnelles
IL-1 β	Interleukine-1 beta
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
iNOS	Synthase d'oxyde nitrique inducible
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KAF	Kinase à adhésion focale
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
LPXTG	Leu-Pro-X-Thr-Gly
LTA	Acide lipotéichoïque
MALT	Tissus lymphoïdes associés à la muqueuse
MAP	Mitogen-activated kinase p38
MCP-1	Protéine chimioattractante de monocyte-1
MEC	Matrice extracellulaire
MLST	Typage par séquençage multiple de gènes
MMP	Métallo-protéinase de matrice
MRP	Protéine relâchée par un traitement à la muramidase

MSCRAMM	Composantes de la surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire
MyD88	Protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88
NaCl	Chlorure de sodium
NF-kB	Facteur nucléaire kappa beta
NOS-2	NO synthase type II
OD	Densité optique
OFS	Facteur opacifiant de <i>S. suis</i>
OVLT	Organum vasculosum de la lamina terminalis
PAEC	Cellules endothéliales d'aorte de porc
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PavA	Facteur de virulence et d'adhérence pneumococcal A
PBMEC	Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porc
PBS	Tampon phosphate
PECAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire endothéliale plaquettaire-1
PG	Peptidoglycan
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
pPBMEC	Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porc primaires
PTS	Phosphotransférase
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted</i>
SAGP	<i>Streptococcal acid glycoprotein</i>
Sao	Antigène de surface un
SCOTS	Capture sélective des séquences transcrites
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Microscopie électronique à balayage
SLY	Suilylsine
SNC	Système nerveux central
Srt	Sortase
ST	Séquence type
STM	Mutagenèse par étiquette-signature
STSS	Syndrome du choc toxique streptococcique
TEER	Résistance électrique trans-endothéliale
TEM	Microscopie électronique à transmission
TJ	Jonctions intercellulaires serrées
THA	Agar Todd-Hewitt
THB	Bouillon Todd-Hewitt
TLR	Récepteur Toll-like
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
UV	Ultra-violet
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1
X	N'importe quel acide aminé
ZO	Zonula occludens

À ma famille et mon conjoint

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement les personnes suivantes :

Le Dr Marcelo Gottschalk pour m'avoir permis d'effectuer mes études supérieures sous sa direction et dans son laboratoire, pour sa confiance, sa grande disponibilité, ses conseils judicieux, ses encouragements et son soutien financier.

La Dre Mariela Segura pour sa co-direction, pour son enthousiasme, son professionnalisme, sa grande disponibilité et pour ses conseils précieux en science, mais aussi sur le monde de la recherche.

Un merci spécial à Sonia Lacouture, assistante de recherche au laboratoire du Dr. Gottschalk, pour sa présence, son amitié, sa confiance, sa disponibilité, ses bons conseils, son aide précieuse et nos discussions scientifiques.

Dina Al-Numani, Bénédicte Bouchet, Geneviève Chabot-Roy, Geneviève Cloutier, Dr Benoît D'Amours, Maria de la Cruz Dominguez-Punaro, Miriam Esgleas, Nahuel Fittipaldi, Richard Graveline, Marie-Pier Lecours, Dre Gabriela Martinez, Diane Meunier-Côté, membres anciens et actuels du laboratoire pour leur amitié et pour m'avoir tant appris aux niveaux scientifique et humain.

Les Dre Josée Harel, Dr John Fairbrother, Dre Monique Doré, Dr Mario Jacques, Dr Daniel Grenier et Dr Charles Dozois pour avoir fait partie de différents comités d'évaluation et m'avoir prodigué de précieux conseils tout au long de mes études de doctorat.

Le Dr Josh Slater, du Royal Veterinary College de l'University of London, pour m'avoir accueillie deux fois plutôt qu'une dans son laboratoire et m'avoir permis d'y effectuer une partie de mon projet.

Tous les professeurs, étudiants et membres du personnel du GREMIP qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet pour leur aide, leur disponibilité et leurs conseils.

Cette étude a été rendue possible grâce au support financier des organismes suivants : Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie du Canada (CRSNG), du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) et du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Tout au long de mes études supérieures, j'ai reçu des bourses d'excellence des organismes suivants : CRSNG, Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), CRIP, Faculté de médecine vétérinaire de l'UdeM, Faculté des études supérieures de l'UdeM et l'Association francophone pour le savoir (Acfas).

Finalement, je tiens à remercier ma famille proche et éloignée, mon conjoint et mes amis pour leur support, leur compréhension et leurs encouragements.

I. INTRODUCTION

Streptococcus suis est un important pathogène porcin. Il est également reconnu comme un agent de zoonose émergent. Chez le porc, les manifestations cliniques les plus fréquemment observées sont la méningite et la septicémie. Il existe 35 sérotypes différents basés sur les déterminants antigéniques de la capsule. Le sérotype 2 est le plus fréquemment isolé et le plus virulent.

Les connaissances sur les facteurs de virulence de *S. suis* sont limitées. Bien que le rôle critique de la capsule polysaccharidique et du facteur opacifiant dans la virulence ait été démontré, grâce à l'utilisation de mutants isogéniques qui se sont avérés moins virulents *in vivo*, la participation à la virulence de plusieurs autres candidats a été proposée, mais demeure nébuleuse. Parmi ceux-ci, on retrouve, entre autres, la suilysine (hémolysine appartenant à la famille des toxines liant le cholestérol et possédant un mécanisme d'action « multi-hit »), une protéine relâchée suite à un traitement à la muramidase, un facteur extracellulaire, plusieurs adhésines (une protéine liant la fibronectine et le fibrinogène, des hémagglutinines, des protéines liant l'albumine, les IgG et le plasminogène) et plusieurs enzymes (protéases, nucléase).

S. suis est fréquemment isolé au niveau du cerveau de porcs souffrant de méningite. Cependant, la plupart des étapes de la pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* ne sont pas connues. Pour se rendre au système nerveux central (SNC) et causer la méningite, *S. suis* doit traverser la barrière hémato-méningée (BBB). Cette barrière est formée des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (BMEC) recouvertes des terminaisons d'astrocytes et est associée avec des pericytes. Elle est responsable du maintien de l'homéostasie à l'intérieur du SNC et est caractérisée par des jonctions intercellulaires serrées qui régulent la circulation des macromolécules, des cellules et des fluides. Cependant, les mécanismes utilisés par *S. suis* pour traverser la BBB sont inconnus.

Des études ont démontré que *S. suis* de sérotype 2 adhère et active les BMEC humaines. Cependant, à l'inverse d'autres pathogènes causant la méningite comme par exemple *Escherichia coli* K1, *Streptococcus pneumoniae* ou *Streptococcus* du groupe B, l'invasion des BMEC par *S. suis* n'a pas été

démontrée. L'activation des BMEC humaines par *S. suis* s'est traduite par la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et d'acide arachidonique qui pourraient jouer un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité de la BBB et, par conséquent, dans l'entrée des bactéries au SNC.

Les interactions entre les BMEC et *S. suis* sont seulement partiellement caractérisées et les interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales provenant de son hôte naturel; le porc, n'ont fait l'objet d'aucune étude jusqu'à présent. **Nous proposons** que chez le porc, les interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales porcines pourraient jouer un rôle clé dans la pathogenèse de la méningite et qu'elles pourraient différer de celles observées avec les cellules endothéliales humaines. Ainsi, comparativement au porc, peu d'humains développent une méningite à *S. suis*.

L'**objectif général** du projet de recherche est d'étudier les mécanismes utilisés par *S. suis* sérotype 2 pour traverser la BBB et atteindre le SNC chez le porc. Il se divise en trois **sous-objectifs** :

- 1) Étudier et caractériser l'adhérence et l'invasion des cellules endothéliales porcines par *S. suis* sérotype 2 en utilisant principalement des BMEC porcines immortalisées (PBMEC).
- 2) Étudier les conséquences des interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales porcines qui mèneraient à une augmentation de la perméabilité de la BBB.
- 3) Identifier des facteurs de virulence potentiels impliqués dans l'invasion des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux porcines (PBMEC).

II. RESCENCION DE LA LITTÉRATURE

1) *Streptococcus suis*

1.1) Aspects généraux de *S. suis*

Streptococcus suis est une bactérie capsulée à Gram positif. On la retrouve seule, en paire et rarement en chaîne. Elle est anaérobie facultative et forme de petites colonies grises et α -hémolytiques en présence de globules rouges de plusieurs espèces animales. Par contre, elle produit des zones d'hémolyse β sur les milieux contenant du sang de cheval (78). *S. suis* est caractérisé par l'absence de croissance en présence d'une concentration de 6.5% de NaCl, un résultat négatif au test de Voges-Proskauer et la production d'acide dans des bouillons contenant du tréhalose et de la salicine (160).

1.2) Sérotypes

En 1951, Jansen et van Dorssen ont décrit pour la première fois des cas de méningo-encéphalites porcines à partir desquels des streptocoques α -hémolytiques ont été isolés (180). Par la suite, de Moor classifia ces streptocoques en quatre nouveaux groupes de Lancefield : les groupes R, S, RS et T (78). Cependant, Elliott démontra plus tard que *S. suis* faisait plutôt partie du groupe D de Lancefield (103). En fait, l'acide lipotéichoïque (LTA), i.e. l'antigène de la paroi cellulaire de la bactérie servant à classer les streptocoques parmi le groupe D, était masqué par les antigènes de la capsule polysaccharidique de *S. suis* dont de Moor s'était servi par erreur. *Streptococcus suis* a été officiellement reconnu en 1987 (196). Dans leur étude, Kilpper-Bälz et Schleifer font la démonstration que *S. suis* est génétiquement homogène et diffère suffisamment des autres membres du groupe D de Lancefield pour constituer une nouvelle espèce (196). À ce jour, 35 sérotypes (sérotypes 1 à 34 et 1/2) (aussi appelés types capsulaires ou sérovars dans la littérature), basés sur le type capsulaire (158), ont été décrits (161). L'épitope servant au sérotypage a été identifié chez le sérotype 2 comme étant l'acide N-acétyl neuraminique (191). En 1975, Windsor et Elliott reclassifièrent les groupes S et R de de Moor par les sérotypes 1 et 2, respectivement (375). Par la suite, le groupe RS a été remplacé par le sérotype 1/2 (262). Plus tard, en 1989, le groupe T a été remplacé par le sérotype 15 par Gottschalk *et al.* (130). Le

sérotypage peut être effectué par coagglutination, réaction capsulaire ou précipitation en capillaire (160). Cependant, la plupart des laboratoires de diagnostic ont adopté la coagglutination comme méthode de sérotypage (135) puisque certaines trousse commerciales peuvent mener à une identification erronée de certaines souches (et/ou sérotypes) (128, 151, 174, 233, 344).

Le sérotype 2 est le plus fréquemment isolé et le plus virulent (135, 159). Les souches de référence de la plupart des sérotypes proviennent de porcs malades. Par contre, les souches de référence de quelques sérotypes (sérotypes 17 à 19, 21) ont été isolées à partir de porcs asymptomatiques. De son côté, celle du sérotype 14 provient d'un cas de méningite chez l'humain (130). Les souches de référence des sérotypes 20 et 31 proviennent de veaux malades, tandis que celle du sérotype 33, a été isolée chez un agneau malade (130, 161, 262). Il est à noter que le cas des sérotypes 32, 33 et 34 est plus complexe. Ainsi, en analysant la séquence de l'ARN ribosomal 16S, Chatellier *et al* (48) ont regroupé les souches de référence provenant de la plupart des sérotypes dans un seul groupe bien défini. Ces souches étaient inter-reliées, mais séparées des autres streptocoques et entérocoques. Cependant, les souches de références des sérotypes 32, 33 et 34 divergeaient grandement de ce groupe (48). De plus, l'analyse du gène de la chaperonine 60 a démontré que ces deux sérotypes pourraient appartenir à une autre espèce (41). Récemment, une association plus probante avec *Streptococcus orisratti*, une espèce isolée à partir de dents de rats, qu'avec *S. suis* a été démontrée pour les sérotypes 32 et 34, à la différence des autres sérotypes (163).

Dans plusieurs pays d'Europe et d'Asie, le sérotype le plus souvent retrouvé est le sérotype 2 (158, 378). Cependant, le taux de prévalence de ce sérotype varie grandement d'un pays à l'autre. Ainsi, la prévalence du sérotype 2 est de moins de 25% au Canada (157), d'environ 28% au Japon (189), tandis qu'en Espagne et en France, elle est de 51% et de 59% à 69%, respectivement (32, 378).

1.3) Infection et transmission de *S. suis*

1.3.1) Chez le porc

Le porc est l'hôte naturel de *S. suis*. Chez le porc, son habitat naturel est le tractus respiratoire supérieur i.e. les amygdales et les cavités nasales. On retrouve également la bactérie au niveau des tractus alimentaire et génital du porc (159).

S. suis est responsable d'une grande variété de pathologies chez le porc. Ainsi, il a été isolé de cas d'arthrite, de péricardite, de rhinite, d'endocardite, de pneumonie, d'avortement, de vaginite et de septicémie suivie de mort soudaine (158, 289, 305). En Amérique du Nord, *S. suis* est de loin le pathogène isolé le plus souvent de cas d'endocardites porcines, les porcs en souffrant pouvant mourir subitement ou montrer des niveaux variables de dyspnée, cyanoses et dépérissement (158). Cependant, la méningite est la manifestation clinique la plus importante (157, 158, 262) et c'est souvent la base d'un diagnostic présomptif. Des lésions histopathologiques caractéristiques de méningites purulentes apparaissent avec une infiltration diffuse de neutrophiles (331). On observe également la nécrose des vaisseaux dont l'endothélium est gonflé et parfois une occlusion de la lumière par des cellules inflammatoires (288).

La plupart des isolats récupérés de porcs malades appartiennent à un groupe restreint de sérotypes, soit les sérotypes 1 à 8 (157, 189, 278). Le sérotype 1 cause habituellement des infections chez des porcelets âgés de 2 à 6 semaines (342), tandis que le sérotype 2 infecte des porcs de tout âge (159). Cependant, Reams *et al.* ont démontré que 75% des porcs infectés par *S. suis* sont âgés de moins de 16 semaines (278). Il est aussi bon de noter que d'autres sérotypes moins communs tels que les sérotypes 9, 14, 7 et 5 ont également été associés à des infections sévères (63, 150, 158, 337).

La transmission de l'infection à *S. suis* se produit généralement à la suite de l'introduction de porcs porteurs sains dans un nouveau troupeau (transmission horizontale) (159). En effet, il a été démontré que *S. suis* se loge au niveau des amygdales des porteurs sains et qu'il y survit même lorsque ces porcs reçoivent des antibiotiques ou qu'ils développent des anticorps opsonisants (58). Selon

Clifton-Hadley *et al.*, le taux de porteur varie à travers le temps de 0% à 100% à l'intérieur d'un troupeau (59, 60), mais se situe généralement sous la barre des 5%. Plusieurs facteurs prédisposeraient les porcs à une infection par *S. suis* dont la surpopulation, le stress, les grandes variations de température, un taux d'humidité élevé, le mélange et le déplacement de ceux-ci (80). *S. suis* peut également se transmettre de façon verticale. Ainsi, les porcelets sont infectés au moment de la parturition au contact et/ou en avalant les sécrétions vaginales de la truie (12).

Lors d'infections expérimentales, les porcs infectés une première fois deviennent résistants à une nouvelle infection par la même souche ou par une souche du même sérotype (158). Cependant, il est à noter que la protection à long terme n'a pas été évaluée dans cette étude puisque la seconde infection a été réalisée relativement rapidement après la première infection.

D'autres animaux présents au niveau des fermes peuvent agir à titre de vecteurs de transmission tels que les mouches et les souris (105, 370). De plus, *S. suis* peut survivre dans les fèces (104 jours à 0°C, jusqu'à 10 jours à 9°C et jusqu'à 8 jours à 22–25°C), la poussière (54 jours à 0°C et jusqu'à 25 jours à 9°C, mais moins de 24 h à température pièce), l'eau (60°C pendant 10 min) et la nourriture pendant plusieurs jours dépendamment de la température (62, 314). La procédure d'échaudage dans les abattoirs serait donc une source de contamination possible. Par contre, *S. suis* est rapidement inactivé par les désinfectants et les nettoyeurs communément utilisés dans les fermes et les laboratoires et ce à des concentrations moins élevées que celles recommandées par le fabricant (62).

1.3.2) Chez l'humain

Streptococcus suis est un agent de zoonose émergent. Ainsi, au cours des dernières années, on a assisté à une recrudescence sans précédent des cas d'infection à *S. suis* chez l'humain (136, 216). Des cas isolés avaient déjà été et sont sporadiquement rapportés en Asie (Chine (49, 136, 169, 174, 382, 386, 387), Thaïlande (116, 207, 323, 328, 358, 359), Vietnam (222), Japon (45)), en Europe (Pays-Bas (17), Royaume-Uni (55, 91, 148), Espagne (10, 125, 282), France (110),

Allemagne (39, 42), Croatie (201), Danemark (42, 267), Belgique (65), Italie (264), Autriche (313), Hongrie (36), Grèce (230, 361), Suède (51)), en Amérique (États-Unis (366), Canada (233), Argentine (213)) et en Océanie (Nouvelle-Zélande (83)).

La presque totalité des cas d'infections chez l'humain peut être attribuée à une forte exposition à de la viande de porc non-transformée ou à un contact étroit avec des porcs infectés. La contamination pourrait se produire via des lésions cutanées (98) présentes chez les personnes infectées. La plupart du temps, ces personnes infectées sont des travailleurs de l'industrie porcine (321), tels des éleveurs de porc (218), des travailleurs d'abattoir (42, 213, 330), des bouchers (39, 110, 330) et des personnes manipulant des produits dérivés de la viande de porc et des vétérinaires. D'ailleurs, plusieurs études ont recensé un taux de séroprévalence contre *S. suis* plus élevé chez des travailleurs de l'industrie du porc, des fermiers, des inspecteurs et des vétérinaires que chez la population en générale (102, 283, 321). De plus, l'infection à *S. suis* est une maladie à déclaration obligatoire depuis 2005 à Hong Kong (Amendment to Quarantine and Prevention of Disease Ordinance Cap. 141, 2005, www.chp.gov.hk/letters.asp?lang=en&id=31&pid=13). Au Royaume-Uni et en France, l'infection à *S. suis* a été ajoutée au registre des maladies industrielles en 1983 et en 1995, respectivement.

La littérature rapporte également un cas de réinfection, 15 ans après la première infection à *S. suis* sérotype 2 (120), le second épisode ayant été fatal. Selon les auteurs, le patient n'aurait pas développé d'immunité suite à la première infection, ce qui démontre bien l'importance de la prévention constante chez les travailleurs exposés. Ainsi, bien qu'elle soit plus élevée que chez la population en général (voir ci haut), le taux de séroprévalence contre *S. suis* chez les gens de l'industrie porcine est tout de même faible (1% chez les fermiers éleveurs de porc) (102).

Cependant, dans certains cas d'infections à *S. suis* chez les humains, aucune relation avec le porc n'a pu être établie (156). Chez l'homme, des facteurs de risque à l'infection ont été proposés dont un état d'immunosuppression, l'asplénie, le diabète, et l'alcoolisme (17, 201, 207, 213). De plus, il est probable

que des personnes infectées soient des porteurs sains (321), ayant le potentiel de développer la maladie en situation de stress ou d'immunodéficience. Aucune transmission d'humain à humain n'a encore été démontrée ni répertoriée.

Chez l'homme, *S. suis* cause généralement des méningites, purulentes ou non (92, 171, 201, 218, 264), en plus de causer des chocs septiques avec défaillance multiple des organes (201), des endocardites (92, 332, 359, 361), des péritonites (358), des rhabdomyolyses (329), de l'arthrite (affectant différentes articulations) (50, 91, 192), des spondylodiscites (10, 230, 344), des pneumonies (359), des uvéites (68), des endophtalmites (68, 92) et des septicémies (42, 285). Plusieurs séquelles ont été rapportées, mais la perte de l'ouïe (et la dysfonctionnement vestibulaire) reste la séquelle la plus courante chez les patients qui survivent à l'infection (17). Cette séquelle n'est pas reliée à l'usage d'antibiotiques (218).

L'incidence des infections à *S. suis* chez l'humain est probablement sous-estimée à cause d'une mauvaise identification en laboratoire. Ainsi, *S. suis* est parfois confondu avec des entérocoques, *S. pneumoniae*, *S. bovis*, *Streptococcus acidominimus* et streptocoques du groupe viridians (87, 218, 344). De plus, le diagnostic initial basé sur une coloration de Gram du liquide céphalorachidien (CSF) est souvent une méningite à pneumocoque (127).

Des souches provenant de différents sérotypes ont été rapportées dans des cas d'infections chez l'humain. Généralement, ce sont des souches de sérotype 2 (10, 18, 65, 264, 387). De plus, quelques cas d'infection à des souches de sérotypes 4 (17), 14 (130, 364) et 16 (244) ont aussi été rapportés chez l'humain. Deux autres cas d'infection par le sérotype 1 chez l'homme ont aussi été répertoriés, bien que le sérotype n'ait pas été confirmé dans ces cas précis (201).

1.3.2.1) Épidémie humaine en Chine

En 2005, une importante épidémie de cas aigus a été rapportée dans la province du Sichuan, en Chine (248). Cette épidémie a totalement changé la perception de la menace causée par ce pathogène envers l'humain. Au total, 215 personnes ont été infectées par le pathogène, dont 66 cas ont été confirmés en

laboratoire et 39 d'entre eux en sont morts (rapport officiel des Centres pour le contrôle des maladies (Centre for disease control, CDC) chinois du Sichuan et de Beijing). Lors de cette épidémie, les personnes ont contracté la maladie en pratiquant la boucherie de porcs infectés à *S. suis* ou en ingérant de la viande contaminée (388). La plupart des patients étaient des fermiers vivant en contact étroit avec leurs porcs, bien que cinq bouchers et un vétérinaire aient aussi été affectés. En fait, l'épidémie chez l'homme faisait suite à une épidémie porcine locale qui a tué plus de 600 porcs (388).

Même si cette épidémie d'infections à *S. suis* chez l'humain est la plus importante ayant été rapportée, une autre de plus petite envergure est survenue dans la province de Jiangsu (Chine) en 1998 et a touché 25 personnes, dont 14 sont mortes (169). Cependant, elle est restée quasi inconnue en occident puisqu'elle a été rapportée uniquement en chinois dans des journaux chinois. Ce qui fait la particularité de l'épidémie de 2005, en plus du nombre très élevé de cas et du fort taux de mortalité, ce sont les manifestations cliniques qui ont été observées. Ainsi, une forte incidence de maladies systémiques (septicémie et syndrome du choc toxique streptococcique (STSS)) et un faible nombre de cas de méningite ont été répertoriés.

Une hypothèse pour expliquer cette soudaine apparition de maladie et son infectivité élevée serait qu'il y aurait eu émergence d'une nouvelle souche hautement virulente et toxique. Ainsi, en utilisant le typage par séquençage multiple de gènes (MLST), presque tous les isolats ont été classifiés en tant qu'un seul et même clone, i.e. qu'il possédait le même profil allélique ou séquence type (ST), la ST-7, dérivant du complexe ST-1 (386). Ces isolats ST-7 étaient plus toxiques envers les cellules sanguines mononuclées périphériques que les souches de ST-1 (386). De plus, les souches impliquées dans les épidémies humaine et porcine du Sichuan étaient d'une même origine clonale et identiques à la souche responsable de l'épidémie de 1998 dans la province de Jiangsu.

1.3.3) Chez d'autres espèces animales

S. suis est également retrouvé chez d'autres espèces animales comme le sanglier sauvage, le chat, le chien, le chien viverrin (ou tanuki du Japon), les oiseaux, le cheval et les ruminants (22, 52, 58, 81, 82, 149, 168, 194). Quelques cas de transmission de *S. suis* à l'homme par des sangliers sauvages ont d'ailleurs été rapportés (29, 36, 285).

1.4) Traitements et prévention de l'infection

1.4.1) Chez le porc

Le contrôle de l'infection à *S. suis* est basé sur la réduction des facteurs de stress, l'antibiothérapie, l'antibioprophylaxie et la vaccination (190).

La surpopulation, les déplacements des animaux et l'affaiblissement des porcs malades sont des facteurs de stress qui pourraient favoriser le développement d'infections à *S. suis*. Ainsi, on retrouve souvent *S. suis* chez des porcs affectés par la pleuropneumonie porcine ou le syndrome reproductif et respiratoire porcin (146, 336). Une meilleure gestion de ces derniers pourraient donc jouer un rôle primordial dans le contrôle des infections à *S. suis* (61). Lors d'une infection à *S. suis* chez le porc, la mortalité peut atteindre un taux de 20% en l'absence de traitement (63).

Bien que le sevrage précoce soit un moyen relativement efficace pour éliminer plusieurs pathogènes porcins, ce n'est pas le cas pour le contrôle des infections à *S. suis* (220) puisque plusieurs porcelets âgés de quelques jours seulement sont déjà porteurs de la bactérie. Cependant, une étude par Torremorell *et al.* suggère que c'est après le sevrage, lorsque le taux d'anticorps maternel est bas, que les souches de *S. suis* sont détectées pour la première fois chez les porcelets (341). Ainsi, l'immunité passive maternelle contre *S. suis* peut être transférée de la truie à ses porcelets et des études ont rapporté un certain succès de protection chez les porcelets dont la mère avait été vaccinée (13, 34). Des résultats prometteurs ont récemment été obtenus par Swildens *et al.* qui ont démontré, après la mise bas, une élimination de *S. suis* chez sept truies porteuses

et l'absence de transmission à leur progéniture à la suite d'un traitement à l'amoxicilline et d'une vaccination des truies avec des bactéries tuées à la formoline (324). L'immunité humorale joue donc un rôle important dans la protection contre l'infection par *S. suis*. Ainsi, l'immunisation passive de porcs avec des antisérums anti-*S. suis* provenant du porc ou du cheval les protègent contre une infection à *S. suis* (15, 167). Il est également à noter que la présence d'anticorps n'élimine pas les bactéries chez les animaux porteurs.

Des vaccins composés de bactéries entières tuées (bactéries) autogènes sont généralement utilisés pour le contrôle des infections. Cependant, il n'y a pas de vaccin contre *S. suis* qui soit considéré comme efficace chez le porc (158). Par ailleurs, il a été démontré que des souches vivantes non-virulentes pouvaient protéger en partie contre une infection expérimentale par une souche virulente (135). De plus, bien que des vaccins sous-unitaires composés de suilysine ou de MRP et EF aient induit une protection chez la souris et/ou le porc (310, 380), ils ne seraient pas utiles contre la grande majorité des souches nord-américaines puisqu'elles ne produisent pas de suilysine (133), ni contre les souches ne possédant pas les protéines MRP et EF. Par ailleurs, Wisselink *et al.* ont démontré en utilisant un mutant isogénique non-capsulé que la capsule pouvait induire une protection chez le porc (379). Finalement, le design d'un vaccin bien caractérisé et efficace contre *S. suis* demeure un objectif activement poursuivi (135).

L'administration d'antibiotiques peut servir à l'antibioprophylaxie, qui est stratégiquement utilisée lors des périodes de risque élevé (exemple : antibiotiques ajoutés à la nourriture ou à l'eau) ou à l'antibiothérapie lors du traitement des animaux malades (1, 2, 224, 226, 301). Bien que la sensibilité des souches de *S. suis* aux antibiotiques varie selon leur origine géographique, leur sérotype et l'année de leur isolation (1, 2, 224, 226, 301), les antibiotiques suggérés comme étant les plus efficaces contre *S. suis* sont l'amoxicilline, l'ampicilline, la gentamicine, le ceftiofur et l'enrofloxacin (80, 301).

De plus, puisque les signes cliniques de la méningite chez le porc sont associés à l'inflammation du système nerveux central, un traitement avec des anti-inflammatoires peut contribuer au traitement des animaux infectés (158).

1.4.2) Chez l'humain

Il n'existe aucun vaccin contre *S. suis* disponible pour une utilisation chez l'homme. Par contre, la pénicilline G administrée par voie intraveineuse est utilisée pour traiter la plupart des cas d'infections puisque la majorité des isolats de *S. suis* sont sensibles à cet antibiotique (218, 347, 358). L'ampicilline et le chloramphénicol peuvent aussi être utilisés en combinaison avec un aminoglycoside (92, 171, 192, 383). Cependant, la prudence est de mise puisque certaines souches résistantes à la pénicilline ont été isolées chez 6 à 28% des porcelets étudiés (158, 171) et que certains isolats provenant de cas d'infections chez l'homme se sont révélés résistants à la norfloxacine (332). De plus, puisque deux cas de recrudescence de la maladie ont été rapportés après 2 et 4 semaines de traitement aux antibiotiques, le traitement devrait se prolonger pendant au moins 6 semaines (383).

1.5) Les facteurs de virulence proposés de *S. suis*

Il n'existe pas de définition précise sur ce qu'est la virulence d'un pathogène, ce qui entraîne des contradictions au niveau de la littérature à propos de la définition d'un facteur de virulence (131, 135, 136). De plus, l'utilisation de paramètres différents pour considérer une souche comme virulente ou non vient ajouter plus de confusion (131). Lorsqu'on ne dispose pas de données pour prouver le rôle critique d'un facteur dans la virulence, on le considère tout de même comme un marqueur de virulence.

La participation de plusieurs composantes bactériennes de *S. suis* à la virulence a été proposée. Cependant, la plupart de ces facteurs ne sont pas absolument nécessaires à la virulence ou sont présents à la fois chez les souches virulentes et non-virulentes. De plus, la virulence de certains mutants knock-out pour ces facteurs n'a pas été vérifiée ou il n'existe tout simplement pas de mutants knock-out pour certains facteurs. Ainsi, seule la participation à la virulence de la capsule polysaccharadique a été confirmée.

1.5.1) Capsule polysaccharidique

La capsule polysaccharidique (CPS) est le seul facteur dont la participation à la virulence ait été prouvée (46, 307). Cette CPS protège *S. suis* contre la phagocytose (44, 46, 307) et pourrait donc l'aider à survivre au niveau de la circulation sanguine. De plus, une étude utilisant un système de mutagenèse par étiquette-signature (STM) a identifié des gènes reliés à la biosynthèse de la capsule parmi un groupe de gènes potentiellement impliqués dans la virulence de *S. suis* (374). Cependant, d'autres facteurs sont également essentiels à la virulence de cette bactérie puisque la plupart des souches non-virulentes sont capsulées (135). La CPS de *S. suis* est composée de cinq sucres différents: le rhamnose, le galactose, le glucose, le N-acétyl glucosamine et l'acide N-acétyl neuraminique (acide sialique) (104, 191). Le locus *cps2* codant pour la CPS de sérotype 2 a été cloné et caractérisé (307, 308). Il contient des gènes codant pour des activités potentielles de glucosyltransférase, de galactosyltransférase, de N-acétylglucosaminyltransférase, de rhamnosyltransférase, de synthèse d'acide sialique et des transposases (307, 308).

1.5.2) OFS

Récemment, Baums *et al.* (21) ont décrit un facteur opacifiant (OFS) chez *S. suis* de sérotype 2 qui s'est avéré nécessaire à sa virulence. Cet OFS possède un motif LPXTG et partage des homologies de structure avec des membres de la famille des MSCRAMM (composantes de la surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire). Bien que l'OFS soit impliqué dans la virulence de *S. suis*, il ne serait pas impliqué dans la colonisation des voies respiratoires par cette bactérie (21). De plus, tout comme la CPS, ce facteur est présent à la fois chez les souches virulentes et non-virulentes de *S. suis* (136). Toutefois, une étude récente de Takamatsu *et al.* (327) a démontré qu'environ 30% des isolats seulement possèdent un OFS fonctionnel de type-1.

1.5.3) MRP et EF

La protéine relâchée à la suite d'un traitement à la muramidase (MRP) est une protéine de 136 kDa possédant un motif LPXTG. Elle est associée à la paroi

cellulaire, mais elle est aussi relâchée dans le milieu de culture durant la croissance. Pour ce qui est du facteur extracellulaire (EF), il s'agit d'une protéine de poids moléculaire de 110 kDa qui se retrouve dans le surnageant de culture de la bactérie (355). Les protéines MRP* (>136 kDa) et MRPs (<136 kDa) sont des variantes de la protéine MRP. Une variante de la protéine EF a également été identifiée, soit la protéine EF* (>150 kDa) (133, 309, 378). Ainsi, en plus des phénotypes habituels composés de MRP et EF, les phénotypes suivants ont été identifiés : MRP*EF-, MRP_sEF-, MRP_sEF+ et MRP-EF*. Ces phénotypes sont toutefois de virulence variable ou incertaine (133, 309, 378). On a démontré la production de MRP et/ou EF (ou leurs variantes) chez des souches de sérotypes 1, 2, ½, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 14, 15, 16 et 22 (32, 378).

Il existe une association positive entre la présence de ces deux protéines et la virulence des souches européennes de *S. suis* (217). De plus, il a été suggéré que les souches européennes de sérotype 2, surtout celles possédant MRP, EF et la suilysine (voir ci bas) étaient plus virulentes que les souches virulentes nord-américaines (135). Aucune souche non-virulente possédant ces protéines et la suilysine (voir ci bas) n'a été identifiée jusqu'à présent. Cependant, des mutants isogéniques pour MRP ou EF se sont avérés aussi virulents que leurs souches parentales chez le porc (311). D'autre part, l'absence d'une ou deux de ces protéines n'est pas nécessairement associée à une absence de virulence. En effet, quelques souches européennes virulentes et la plupart des souches nord-américaines virulentes ne possèdent pas MRP, EF et la suilysine (32, 123, 133, 274, 294). Donc, on considère ces deux protéines, ainsi que la suilysine (voir ci bas), comme des marqueurs de virulence et non comme des facteurs de virulence (355). Malheureusement, le rôle des protéines MRP et EF n'a pas été clairement défini.

1.5.4) Suilysine

En 1994, Jacobs *et al.* ont identifié une hémolysine, nommée suilysine chez *S. suis*, de 54 kDa chez le sérotype 2 (177). Par la suite, Gottschalk *et al.* ont caractérisé une hémolysine de 65 kDa. Il s'agissait de la même hémolysine et la variation dans le poids moléculaire était due à la méthode de purification (137). Le

gène *sly* codant pour la suilysine a été séquencé en 1998 par Sergers *et al.* (294). Il est présent chez la plupart des sérotypes de cette espèce. Plus précisément, il a été retrouvé chez des souches des sérotypes 1, ½, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 28 (199, 251, 294). Une étude de Takamatsu *et al.* a démontré que le gène codant pour la suilysine pourrait avoir été acquis d'une source étrangère et se serait répandu via une recombinaison homologue (326). De plus, l'expression du gène *sly* serait réprimée par le gène *manN*, codant pour un homologue d'une mannose perméase IID appartenant à un système de phosphotransférase (PTS) spécifique au mannose (215).

La suilysine forme des pores transmembranaires à la surface de la cellule cible et plusieurs molécules de la suilysine sont nécessaires à l'assemblage d'un seul de ces pores (mécanisme « multi-hit ») (137, 177). La suilysine pourrait jouer un rôle dans la destruction et l'invasion de différents tissus et cellules par *S. suis*. Ainsi, la suilysine est cytotoxique envers plusieurs de types cellulaires causant des dommages chez les cellules épithéliales (204, 249), endothéliales (47), les neutrophiles (44), les monocytes et les macrophages (295). La suilysine est également impliquée dans la sécrétion d'acide arachidonique, un précurseur de la prostaglandine, par des cellules endothéliales humaines (182). De plus, elle stimule la production de cytokines pro-inflammatoires par des monocytes humains et porcins (214).

Bien que des anticorps dirigés contre la suilysine fournissent une protection lors d'une infection expérimentale chez la souris et le porc (177, 178), le rôle critique pour la virulence de la suilysine demeure controversé. Ainsi, un mutant non-hémolytique s'est montré non-virulent chez la souris, mais seulement légèrement atténué chez le porc (7). De plus, une étude utilisant trois mutants non-hémolytiques de trois souches différentes n'a démontré aucune atténuation de la virulence dans un modèle d'infection porcin (214). Finalement, tel que mentionné précédemment, certaines souches virulentes ne possèdent pas la suilysine (9).

La suilysine fait partie de la famille des toxines activées par les groupements thiol aussi connues sous le nom de toxines cytolytiques liant le cholestérol (137, 177, 257). Cette famille est composée de la listériolysine, la

pneumolysine et de la streptolysine O entre autres (257). Cette famille est caractérisée par une perte d'activité en conditions oxydantes et par une réactivation en conditions réductrices. Vu son affinité pour le cholestérol, elle est inhibée suite à l'addition de cette substance dans le milieu de culture. L'analyse de la séquence du gène de la suilysine a démontré qu'elle est plus phylogénétiquement reliée avec la pneumolysine de *S. pneumoniae* qu'avec les autres toxines de cette famille (294).

1.5.5) Adhésines

1.5.5.1) FBPS

Récemment, une protéine de 64 kDa, immunogénique chez le porc et liant la fibronectine et le fibrinogène (FBPS) a été identifiée (76). Puisqu'elle lie des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), les auteurs suggèrent qu'elle pourrait participer à la colonisation des organes par *S. suis*. De par sa structure, elle ne fait toutefois pas partie de la famille des composantes de la surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire (MSCRAMM). Bien que le gène *fbps* soit présent chez la majorité des sérotypes de *S. suis* et qu'on ait cloné et vérifié l'activité de la protéine FBPS, l'expression de la protéine FBPS n'a pas été vérifiée chez les différents sérotypes et phénotypes. L'utilisation d'un mutant knock-out pour cette protéine a démontré que bien que la FBPS ne soit pas impliquée dans la colonisation des amygdales, elle pourrait jouer un rôle au niveau de la colonisation de certains organes (76).

1.5.5.2) GAPDH

S. suis possède une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de 39 kDa qui lie l'albumine (273) et favorise l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales (362). De plus, suite à l'addition d'albumine au milieu de croissance de la bactérie, sa virulence est augmentée chez un modèle de souris (273, 275). Brassard *et al.* ont démontré que l'adhésion de *S. suis* à des cellules de trachée de porc diminuait suite à l'addition d'albumine (38). En 2004, Jobin *et al.* ont trouvé que la GAPDH était responsable en partie de la liaison de *S. suis* au plasminogène humain et porcin (181). L'adhésion et l'activation du plasminogène

pourraient être impliquées dans l'invasion et la destruction des tissus par *S. suis* en contribuant à la dégradation de la fibronectine (181). Cependant, son rôle dans la virulence est incertain puisque la protéine est aussi présente chez les souches non-virulentes (273). La présence du gène de la GAPDH a été démontrée chez tous les sérotypes testés suivants : 1, 2, 7 et 9 (273, 362).

1.5.5.3) Alpha-énolase

Serhir *et al.* ont caractérisé une protéine de *S. suis* liant la portion Fc des IgG de plusieurs espèces de mammifères (porcin, humain, bovin, lapin et murin) et les IgA humains (302, 303). En plus de lier la fibronectine, cette protéine de 52 kDa a la particularité de lier les IgY de poulet (302, 303). Cette protéine peut être relâchée dans le milieu durant la croissance ou demeurer à la surface la bactérie. De plus, une protéine de stress, Hsp60, a été identifiée chez *S. suis* et elle a été détectée chez les sérotypes 1 à 8, 10 et 1/2 (27). En 1998, Benkirane *et al.* prouvèrent que la Hsp 60 et la protéine de 52 kDa liant les IgG sont la seule et même protéine (28). Par la suite, Esgleas *et al.* (107) la renommèrent selon sa fonction d'alpha-énolase. Le rôle exact de cette protéine dans la virulence est inconnu. Cependant, il est suggéré qu'elle pourrait contribuer à l'évasion de la bactérie du système immunitaire en la masquant des IgG liées par leur portion Fc, ce qui limiterait le phénomène d'opsonisation (302). En 2007, la présence de l'α-énolase à la surface des 35 souches de référence de *S. suis* a été rapportée par Esgleas *et al.* (107). Comme la GAPDH décrite précédemment, en plus d'adhérer adhère à la fibronectine, l'α-énolase adhère également au plasminogène. Par ailleurs, l'α-énolase est immunogénique et des anticorps dirigés contre elle ont été retrouvés chez des porcs convalescents (107). Cette multifonctionnalité de l'α-énolase pourrait servir à différentes étapes de la pathogenèse de *S. suis* telles qu'à l'adhésion aux tissus et à l'évasion du système immunitaire de l'hôte.

1.5.5.4) Hémagglutinines

En 1989, Kurl *et al.* ont décrit une propriété d'hémagglutination spécifique de *S. suis* à certains sucres (202). Ainsi, certaines souches de différents sérotypes possèdent des adhésines sensibles à la trypsine reconnaissant le galactose et/ou

le N-acétylgalactosamine, ou de l'acide sialique. Par la suite, Gottschalk *et al.* ont démontré la capacité de *S. suis* d'hémagglutiner les globules rouges de plusieurs espèces (132). En 1992, Liukkonen *et al.* (212) ont démontré que les souches liant l'acide sialique ciblent les récepteurs glycanes α 2-3 poly-N-acétyllactosamine sialés. En 1993, Haataja *et al.* (145) ont démontré que les souches reconnaissent le galactose et/ou le N-acétylgalactosamine à l'aide de la séquence dissacharidique galactosyl α 1-4Galactose (Gal α 1-4Gal) présente dans le céramide trihexosyl (GbO₃), glycolipide exprimé à la surface des érythrocytes porcins du groupe sanguin P et dans plusieurs tissus porcins. De plus, le GbO₃ pourrait représenter le récepteur pour les souches liant le galactose au niveau de l'épithélium pharyngal porcin (145). En 1995, l'adhésine bactérienne de 18 kDa responsable de la liaison au Gal α 1-4Gal, l'adhésine P, a été identifiée (339). Deux sous-types d'hémagglutinines ont été identifiés selon leurs ligands. Ainsi, l'adhésine Po lie le galactose, tandis que l'adhésine Pn lie le galactose et le N-acétylgalactosamine. En plus d'être présente chez toutes les souches virulentes et non-virulentes testées jusqu'à présent, l'adhésine P est hautement immunogène et induit une activité bactéricide chez la souris (338), ce qui laisse suggérer aux auteurs l'utilisation potentielle de l'adhésine comme antigène d'un vaccin. L'adhésine P a été détectée chez les sérotypes 1, 2, 4, 5, 7 et 8 (338).

1.5.6) Protéases

Les protéases bactériennes sont impliquées dans une panoplie de fonctions telles que l'acquisition de nutriments et la destruction des tissus. Récemment, la production de plusieurs protéases a été décrite chez *S. suis*. Parmi ces protéases, on retrouve l'Arg-aminopeptidase, une protéase à l'activité pseudo-chymotrypsine, une protéase à l'activité caséinase, la dipeptidyl peptidase IV, la phospholipase C, ainsi que l'hyaluronate lyase (8, 182, 184).

L'Arg-aminopeptidase de 55 kDa peut être retrouvée de façon extracellulaire ou associée à la bactérie. Elle pourrait être impliquée dans la production d'ATP ou d'autres précurseurs métaboliques via la voie arginine déiminase. Ensuite, une protéase à l'activité caséinase de la classe des métalloprotéases, pouvant avoir une utilité nutritionnelle ou aider à la maturation de précurseurs, a été décrite. Par

ailleurs, il a été suggéré qu'elle pourrait aider à la maturation de la suilysine chez *S. suis*, comme c'est le cas d'une caséinase décrite chez *Aeromonas salmonicida* qui participe à la maturation de son hémolysine (340). Enfin, la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) de 70 kDa est retrouvée dans le surnageant de culture et à la surface bactérienne de *S. suis* (184). Elle pourrait cliver spécifiquement les protéines ayant un X-Pro ou un X-Ala à leur extrémité N-terminale, ce qui inclut plusieurs cytokines (185). La DPP IV de *S. suis* pourrait aussi être impliquée dans la destruction des tissus et la dissémination bactérienne systémique, comme c'est le cas pour la DPP IV de *P. gingivalis* (4). Ces trois protéases sont produites par le sérotype 2 ainsi que par les sérotypes, 1, 1/2 et 3. Finalement, une sérine protéase de type pseudo-chymotrypsine, détectée seulement chez les souches virulentes européennes de sérotype 2 d'origine porcine ou humaine a été rapportée par Jobin *et al.* (184).

Une activité phospholipase C a été détectée à la surface et dans le surnageant de *S. suis* de sérotype 2 (182). La phospholipase C hydrolyse la phosphatidylcholine en choline phosphate et en diacylglycérol, une molécule messagère activant la protéine kinase C qui est impliquée dans la production d'acide arachidonique par la cellule cible (182). Cette activité phospholipase C semble impliquer la présence de la suilysine et d'autres molécules non-identifiées (182).

En 2004, une hyaluronate lyase a été rapportée par Allen *et al.* (8). Le gène de cette protéase est retrouvé chez tous les isolats de sérotype 2, mais la protéase active est retrouvée chez seulement environ 30% d'entre eux (8). Ces isolats sont souvent associés à des cas de pneumonies (198). L'hyaluronate lyase est sécrétée et, comme son nom l'indique, dégrade l'acide hyaluronique, qui est un glycosaminoglycan réparti largement parmi les tissus conjonctif, épithélial et nerveux, afin d'obtenir des nutriments nécessaires à la croissance du pathogène ou même favoriser son invasion des tissus de l'hôte (8). King *et al.* ont détecté une activité hyaluronate lyase chez des souches de sérotypes 1, 1/2, 2, 3, 7, 9, 14 et 15 (198).

1.5.7) Autres protéines associées à la pathogenèse de l'infection ou à la virulence

1.5.7.1) Fimbriae

Des fimbriae péritriches ont été découverts chez *S. suis* de sérotypes 1 à 8 et 1/2 (179). Ces fimbriae courts et petits mesurent jusqu'à 250 nm, possèdent un diamètre d'environ 2 nm et leur densité varie beaucoup entre les bactéries. De plus, des fimbriae similaires ont également été observés à la surface de souches hémagglutinantes et non-hémagglutinantes par Gottschalk *et al.* (132). Par contre, la participation de ces fimbriae dans l'hémagglutination, l'adhésion ou à la virulence de *S. suis* demeure inconnue.

1.5.7.2) Protéine Sao

La protéine Sao ("surface antigen one") est une protéine immunogénique qui est exprimée à la surface bactérienne possédant un motif LPXTG (211). De plus, lors d'une infection expérimentale, elle confère une protection aux animaux immunisés avec la même protéine (210).

1.5.7.3) Glutamate déshydrogénase

Une glutamate déshydrogénase (GDH) de 45 kDa est exposée à la surface de la bactérie (253). Le gène codant pour cette GDH est conservé chez les souches de sérotype 2 testées. Les auteurs ont distingué un profil d'activité GDH différent suite à une coloration sur un gel non-dénaturant entre les souches hautement virulentes de sérotype 2 et les souches modérément virulentes et non-virulentes. Les sérums de porcs infectés expérimentalement avec *S. suis* de sérotype 2 ont réagi avec la protéine GDH recombinante, ce qui laisse suggérer aux auteurs qu'elle pourrait servir d'antigène pour la détection d'infection à *S. suis*.

1.5.7.4) Prolipoprotéine signal peptidase

Une prolipoprotéine signal peptidase (SP-ase), la protéine Lsp, a également été décrite chez *S. suis* de sérotype 2 (77). La SP-ase II est impliquée dans le détachement du peptide signal des prolipoprotéines modifiées par un glycéride. Un

mutant isogénique sans Lsp s'est avéré incapable d'enlever correctement ce peptide des lipoprotéines, incluant un homologue de la lipoprotéine PsaA (« pneumococcal surface protein A ») de *S. pneumoniae* qui inhibe l'activation du complément, provoque une immunité systémique protectrice et dont la présence s'est montrée nécessaire à la virulence (73, 345). Cependant, lors d'une infection expérimentale chez le porc, le mutant isogénique sans Lsp de *S. suis* s'est montré aussi virulent que sa souche parentale (77).

1.5.7.5) Protéine inconnue de 38 kDa

En 2005, une protéine immunogénique inconnue de 38 kDa présente à la surface et dans des extraits de paroi cellulaire de *S. suis* de sérotype 2 a aussi été rapportée (252). Cette protéine est présente chez tous les sérotypes, à l'exception des sérotypes 20, 26, 32 et 33. Des porcs immunisés avec cette protéine ont développé des anticorps spécifiques à elle et ont été complètement protégés à la suite d'une infection expérimentale par une souche de sérotype 2. Cependant, sa séquence en acides aminés s'est montrée homologue à des protéines de fonctions inconnues de plusieurs autres pathogènes tel que *S. pneumoniae*, *Streptococcus mutans* et *Listeria monocytogenes*, entre autres. Plus tard, les auteurs de cette étude l'ont classée comme une phosphoglycérate mutase potentielle (numéro d'accès à GenBank AF389083), enzyme faisant partie du cycle de la glycolyse. Les auteurs suggèrent que bien que son rôle au niveau de la pathogénèse reste à déterminer, elle pourrait servir d'antigène pour la détection d'infections causées par *S. suis*.

1.5.7.6) Nucléase SsnA

On a aussi suggéré l'implication d'une nucléase de 108 kDa sécrétée par les souches de sérotypes 1 à 9 au niveau de leur virulence (117). Ainsi, la nucléase SsnA de *S. suis* est spécifique à l'ADN linéaire simple ou double brin et son activité est dépendante de la présence de calcium et de magnésium. On a isolé des bactéries produisant SsnA dans le cerveau, les articulations et autres organes d'animaux infectés (117).

1.5.7.7) Protéine membranaire de 44 kDa

Une protéine membranaire de 44 kDa de fonction inconnue avec un rôle potentiel dans la virulence, a aussi été rapportée chez *S. suis* de sérotype 2 (129). Ainsi, des souches mutantes pour cette protéine sont non-virulentes chez la souris. La présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine dans un antisérum confère une protection complète contre la bactérie (129).

1.6.8) Activité superoxide dismutase

Une activité superoxide dismutase a été décrite chez *S. suis* de sérotype 2 (205). Elle pourrait jouer un rôle dans la survie de la bactérie à la phagocytose par les macrophages. En effet, l'activité superoxide dismutase inhibe l'action de l'anion superoxide, un agent bactéricide retrouvé à l'intérieur des phagolysosomes des macrophages (205).

1.5.7.9) Protéines du système arginine déiminase

Deux protéines de surface de *S. suis* dont l'expression est induite à de hautes températures, présentant une homologie élevée avec des protéines du système arginine déiminase (ADS) de *Streptococcus pyogenes* ont été rapportées (376). Une de ces protéines, codée par le gène *octS*, possède un poids moléculaire de 47 kDa et présente des homologies de séquence avec une ornithine carbamoyl transférase, tandis que la deuxième protéine de 53 kDa, codée par le gène *adiS*, est homologue à la glycoprotéine acide (« streptococcal acid glycoprotein » ou SAGP) de *S. pyogenes*. Le gène *adiS* est présent chez toutes les souches de sérotypes 2 et 9 testées (376). De plus, l'expression de la protéine AdiS, qui est similaire à la SAGP, a été confirmée chez des souches de sérotypes 2 et 9 sélectionnées au hasard et une activité arginine déiminase a été détectée. Par ailleurs, on a détecté l'expression de AdiS à la surface de la bactérie en association avec la CPS. Le système ADS est un système enzymatique fournissant une source d'ATP dérivant du catabolisme de l'arginine en citrulline (43). Cette activité est acido-tolérante et permet aux bactéries la possédant de survivre à l'acidification du milieu en lui permettant de produire de l'ammoniac (NH₃) pour augmenter le pH. Récemment, l'utilisation d'un mutant knock-out pour

le gène *adiS* (rebaptisé *arcA* dans cette étude), chez qui l'expression de l'opéron *arcABC* (du système ADS) était compromise, a démontré que cet opéron contribuait à la survie de la bactérie en conditions acides (144).

1.5.7.10) Sortases

En 2002, cinq sortases ont été décrites chez *S. suis* de sérotype 2 par Osaki *et al.* (256). Ces sortases sont SrtA, SrtB, SrtC, SrtD et SrtE. Par la suite, Dramsi *et al.* ont classifié SrtA sous la classe A; tandis que SrtB, C, D et E ont été regroupées dans la classe C (95). En 2007, une sixième sortase a été décrite chez *S. suis*, c'est une sortase de classe C (113).

La sortase A (SrtA) est une transpeptidase à groupement thiol liée à la membrane qui clive les protéines LPXTG entre le T et le G du motif LPXTG. De plus, elle catalyse la formation d'un lien amine entre le groupement carboxyl des thréonines et le groupement amino des pontages peptidiques croisés de la paroi cellulaire, ce faisant, la SrtA lie de façon covalente les protéines LPXTG à la paroi cellulaire (242, 250). Ce rôle a d'ailleurs été démontré pour la sortase A de *S. suis* (256). On retrouve le gène de la sortase A chez les souches de référence des sérotypes 1 à 28, sauf celles des sérotypes 20, 22 et 26 (255).

Chez *S. suis*, trois gènes de classe C (*srtB*, *srtC*, *srtD*) sont regroupés l'un à la suite de l'autre dans un opéron contenant également des protéines LPXTG. Ils sont présents chez environ 50% des souches virulentes de *S. suis* (T. Sekizaki, observations non-publiées). Les sortases de classe C (SrtB, SrtC, SrtD et SrtE) pourraient ancrer spécifiquement les protéines LPXTG dont les gènes se trouvent à leurs côtés (95).

1.5.7.11) Protéines liant des protéines de la matrice extracellulaire et des protéines plasmatiques

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau structural complexe qui soutient les cellules épithéliales et endothéliales et entoure les cellules des tissus conjonctifs (272). La composition de la MEC diffère entre les différents organes.

Cependant, les composantes majeures de la MEC demeurent les mêmes; les glycoprotéines telles que le collagène, la fibronectine, l'élastine, et la laminine et les glycosaminoglycans, tels que l'héparine et l'héparan sulfate (272). Suite à des lésions ou des traumatismes, la MEC est exposée et ses composantes peuvent servir de récepteurs potentiels pour des bactéries pathogènes. De plus, les bactéries pourraient lier les protéines plasmatiques et tissulaires et s'en servir pour masquer ses épitopes immunogéniques dans le but de prévenir sa reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Récemment, l'adhérence de *S. suis* à plusieurs protéines de la MEC et du sérum a été établie (106). Ainsi, *S. suis* de sérotype 2 lie la fibronectine plasmatique et cellulaire et le collagène de types I, III, et V. Les adhésines responsables de ces interactions sont de nature protéique (106). Cependant, les mécanismes impliqués dans ces interactions n'ont pas encore été élucidés chez *S. suis*.

1.6) Pathogenèse de l'infection causée par *S. suis*

Les mécanismes utilisés par *S. suis* pour envahir l'hôte et causer les diverses pathologies qui lui sont associées sont encore peu compris.

1.6.1) Voies d'entrées possibles dans le sang et dissémination dans l'organisme

Les amygdales palatines du porc sont des portes d'entrée importantes et des sites de portage pour plusieurs microorganismes (111). La bactérie pourrait se disséminer au travers de l'organisme à partir du nasopharynx. Ainsi, les amygdales palatines et pharyngales sont considérées comme des portes d'entrée potentielles pour *S. suis* (371) (voir ci bas), lui permettant de se disséminer au travers de la circulation sanguine ou du système lymphatique (221).

Chez l'homme, la bactérie pourrait entrer en circulation par l'entremise de petites coupures ou blessures au niveau de la peau (98).

1.6.1.1) Interactions avec des cellules des amygdales palatines

Les amygdales palatines sont les principaux organes réservoirs où se retrouve *S. suis* chez les porcs malades et porteurs sains (16). Elles font partie des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (MALT). Une étude de Wilson *et al.* (373) a récemment démontré que *S. suis* était retrouvé en association avec des cellules myéloïdes à l'intérieur de ces amygdales. Ces leucocytes exprimaient CD16 et CD163 à leur surface, ce qui laisse penser qu'il s'agirait de macrophages matures. Cette association avec des macrophages conduirait à l'élimination ou au contrôle de la bactérie (373).

Par ailleurs, l'épithélium des cryptes amygdalaires de par sa localisation et sa grande surface augmente le contact entre l'environnement externe et le tissu lymphoïde sous-jacent. Il s'agit d'un type d'épithélium stratifié et squameux qui est largement infiltré par des cellules non-épithéliales (24), i.e. majoritairement des lymphocytes, formant une barrière au travers de laquelle des antigènes peuvent être échantillonnés par ces lymphocytes et transloqués vers le tissu lymphoïde (263). Selon une étude de Salles *et al.* (287), *S. suis* induit un changement dans les sous-populations de leucocytes de ces épithéliums des cryptes amygdalaires. Ainsi, suite à une infection à *S. suis*, les auteurs ont observé une augmentation des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4 et CD8 dans les cryptes des animaux infectés (287), suggérant le développement potentiel de réponses humorale et cellulaire à l'intérieur des amygdales pour interférer avec l'infection à *S. suis*.

1.6.1.2) Interactions avec des cellules épithéliales

Bien que *S. suis* soit retrouvé en faibles quantités à la surface des muqueuses, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) la bactérie traverse ces muqueuses est(sont) peu connu(s) (135). Pour atteindre la circulation sanguine, *S. suis* doit traverser la muqueuse épithéliale des voies respiratoires supérieures.

Il est généralement accepté que *S. suis* adhère aux cellules épithéliales d'origines porcine et humaine (26, 204, 249). Ainsi, quelques études rapportent cette adhésion suite à l'utilisation de cellules provenant de reins porcins et canins,

de poumons humains et de col de l'utérus humain (26, 204, 249). Cette adhésion est potentiellement médiée par des composantes de la membrane cellulaire puisqu'elle est considérablement réduite en présence de la CPS (204, 286, 365). De plus, Gottschalk *et al.* (134) ont démontré que tous les isolats testés provenant de porcs malades adhéraient à des coupes congelées de poumons porcins en comparaison à une faible adhérence de seulement 30% des isolats provenant de porteurs sains. Cependant, Allgaier *et al.* (9), ont rapporté qu'environ seulement 20% des souches isolées chez des porcs en Allemagne adhéraient à des cellules épithéliales de col utérin humain et à des cellules épithéliales de testicules porcines.

S. suis pourrait endommager les barrières épithéliales pour continuer sa progression à travers l'hôte. Ainsi, il a été démontré que la suilysine de *S. suis* et les souches productrices étaient cytotoxiques pour les cellules épithéliales (204, 249). À l'inverse, des souches ne sécrétant pas de suilysine se sont avérées non dommageables pour ces cellules. De plus, du cholestérol liant la suilysine a inhibé cette cytotoxicité (204).

En plus de la lyse cellulaire provoquée par la suilysine, *S. suis* pourrait également utiliser l'invasion cellulaire pour traverser l'épithélium. Par contre, cette possibilité demeure controversée. Ainsi, Lalonde *et al.* n'ont détecté aucune invasion en utilisant plusieurs lignées cellulaires d'origine humaine et de différentes espèces animales dont le porc (204), tandis que Norton *et al.* l'avaient rapportée comme un événement rare (249). Plus récemment, Benga *et al.* ont observé l'invasion de cellules par endocytose médiée par des récepteurs, mais seulement en utilisant des souches non-capsulées (qui sont probablement non-virulentes) ainsi que des souches non-sérotypables (26, 352). De plus, des auteurs allemands ont rapporté que ces souches pouvaient survivre dans ces cellules épithéliales humaines de col utérin selon leur niveau d'expression de la capsule et de la protéine AdiS du système arginine déiminase, tout ceci de façon indépendante de leur cytotoxicité.

Finalement, il est à noter que *S. suis* induit la production de l'interleukine (IL)-6 et de l'IL-8 chez des cellules épithéliales porcines de trachée (NPTr) (communication personnelle, B. Bouchet).

1.6.1.3) Interactions avec des cellules phagocytaires

Les interactions entre *S. suis* avec les cellules phagocytaires qu'il rencontrera tout au long de son périple jouent un rôle déterminant dans la pathogenèse. Cependant, beaucoup de contradictions existent dans la littérature concernant les interactions de *S. suis* avec les phagocytes (135).

Pour se disséminer au travers de l'organisme, *S. suis* doit survivre dans la circulation sanguine. Une fois en circulation, la bactérie peut causer la septicémie ou la mort (135, 221). L'importance pour l'hôte d'éliminer *S. suis* circulant dans le sang est donc considérable puisque une bactériémie persistante précède habituellement les méningites (135).

Par contre, tel que mentionné précédemment, la bactérie possède une CPS qui lui permet de survivre en empêchant la phagocytose. Ainsi, les souches possédant une CPS survivent à la présence de leucocytes dans du sang complet de porc (214), à la présence de macrophages alvéolaires (307), de neutrophiles (57, 275) et dans un modèle d'infection chez la souris (46).

Williams et Blakemore (367, 368) ont suggéré que bien que les bactéries soient phagocytées par les monocytes, seules les souches virulentes pourraient survivre à l'intérieur des phagocytes (367, 368). De plus, les auteurs rapportent que des macrophages murins peuvent phagocyter *S. suis in vitro* (en absence d'anticorps et de complément) (367). Par contre, d'autres études indiquent que la bactérie reste plutôt adhérente à l'extérieur des monocytes, associée à leur surface (295). Ainsi, les souches capsulée de *S. suis* ne sont pas phagocytées par les macrophages murins, elles y adhèrent plutôt à l'extérieur (295, 300). Cette protection contre la phagocytose est médiée par la CPS puisque des mutants non-capsulés sont rapidement phagocytés et détruits par les cellules phagocytaires (46, 300, 307). Plus spécifiquement, il a été démontré que la CPS de *S. suis* inhibait le

processus de signalisation menant à la phagocytose chez les macrophages murins (296).

Tel que mentionné précédemment, la suilysine est cytotoxique pour les macrophages (295) et les neutrophiles (44), ce qui pourrait permettre à la bactérie d'éviter la réponse immunitaire innée. De plus, Chabot-Roy *et al.* (44) ont récemment démontré que la suilysine interférait avec la capacité des neutrophiles porcins à tuer la bactérie par la voie du complément en affectant l'opsonisation de *S. suis* et la capacité bactéricide de ces cellules phagocytaires.

Les interactions entre *S. suis* et les cellules phagocytaires sont importantes dans l'apparition de l'inflammation au cours de sa pathogenèse. Son contact avec des macrophages murins induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et IL-6), en plus d'induire la sécrétion de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 et la protéine chimioattractante de monocyte-1 (MCP-1) par des monocytes humains (lignée THP-1) (295, 297, 298). Chez ces monocytes, TNF- α et IL-1 β sont impliqués dans l'amplification de la cascade de sécrétion des cytokines (298).

Récemment, Segura *et al.* ont également démontré que *S. suis* stimulait les cellules sanguines de sang complet de porc à produire les médiateurs de l'inflammation suivants : TNF- α , IL-1 β , IL-6 à de hauts niveaux et IL-8, MCP-1 à des niveaux intermédiaires (299). La composante majeure à l'origine de cette stimulation est la paroi cellulaire bactérienne, bien que la capsule soit responsable de la sécrétion de MCP-1.

Dans un modèle murin de choc septique, *S. suis* induit des niveaux plasmatiques élevés de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6, IL-12, interféron gamma et des chimiokines MCP-1, KC et RANTES (l'acronyme de *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted*) (CCL5) qui pourraient être en partie responsables de la mort soudaine de certains animaux bien que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 soit aussi produite chez ces souris, ce qui pourrait indiquer un certain mécanisme de régulation négative pour essayer de contrôler la forte réponse inflammatoire causée par *S. suis* (86).

Par ailleurs, en l'absence d'anticorps dirigés contre *S. suis*, les neutrophiles et les monocytes sont incapables de tuer cette bactérie (44). De plus, l'ajout de ces anticorps à du sang complet de porc supprime la croissance bactérienne en plus de provoquer une baisse significative de la production de cytokines par les cellules sanguines stimulées par *S. suis* (299).

1.6.1.3.1) Récepteur impliqué dans la stimulation des cellules phagocytaires et la cascade signalétique subséquente

L'identité des récepteurs cellulaires ciblés par *S. suis* et impliqués dans l'activation des monocytes et des macrophages est partiellement connue. Récemment, il a été démontré que *S. suis* utilise le récepteur Toll-like 2 (TLR2), une glycoprotéine membranaire de type I, et le CD14, une protéine ancrée par le GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) qui aide à la reconnaissance de *S. suis* par le TLR2, pour interagir avec des monocytes humains (139, 298). Cette interaction induit la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et de MCP-1, elle est réduite par des anticorps dirigés contre TLR2, en plus d'influencer l'expression relative des ARN messagers de TLR2 et de CD14.

De plus, l'utilisation de macrophages murins ne possédant pas de TLR2 ou MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), une molécule adaptatrice impliquée dans la cascade signalétique des TLR, a permis de démontrer que *S. suis* induisait une réponse inflammatoire dépendante de MyD88 (139). Ces résultats révèlent que la CPS interfère avec l'habileté de *S. suis* d'interagir avec ses cellules cibles. Ainsi, chez un mutant non-capsulé, la paroi cellulaire est exposée et induit la sécrétion de cytokines et de chimiokines via une voie dépendante de TLR2 (139). Cependant, la stimulation des cellules n'est pas entièrement dépendante de TLR2 et CD14. Ainsi, des productions de cytokines et de chimiokines indépendantes de TLR2 (139) et de CD14 (298) ont également été rapportées. De plus, tout comme avec les cellules sanguines de porc, la CPS contribue à la production de MCP-1 chez les macrophages murins. Graveline *et al.* (139) ont par ailleurs démontré que cette stimulation était indépendante de la molécule MyD88.

1.6.1.4) Interactions avec des cellules endothéliales périphériques

S'il survit aux étapes précédentes, la pathogenèse de *S. suis* l'amènera à interagir avec les cellules endothéliales périphériques au niveau de la circulation sanguine. Par contre, les interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales périphériques sont quasi inconnues. Les seules informations disponibles dans la littérature sont rapportées par une étude de Charland *et al.* (47) et une autre de Vadeboncoeur *et al.* (351) dans lesquelles des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVEC) ont été utilisées. Ces études rapportent qu'à toute fin pratique, *S. suis* n'adhère pas (ou très peu) à ces cellules, ni ne les stimule à produire des cytokines pro-inflammatoires.

1.6.2) Voies d'entrées possibles dans le système nerveux central

Tout d'abord, il est important de savoir que la BBB, formée de BMEC, et la barrière sang-liquide céphalorachidien (CSF), formée de cellules épithéliales du plexus choroïde, séparent toutes les deux le SNC de la circulation sanguine. Bien qu'il existe une confusion générale dans la littérature sur le regroupement ou non de ces deux barrières sous le terme général de BBB, cette revue utilisera ces deux termes de façon indépendante en tant que deux entités distinctes. Une description détaillée de la BBB sera donnée ci-dessous tandis qu'une description sommaire de la barrière sang-CSF sera rapportée à la section 1.6.2.2.

Comment *S. suis* atteint-il le système nerveux central? À ce jour, bien peu d'informations sont connues sur cette étape clé de la pathogenèse de la méningite chez le porc. Ces informations sont rassemblées dans les paragraphes suivants.

1.6.2.1) Interactions avec des cellules endothéliales de la BBB

En plus des cellules endothéliales périphériques, *S. suis* va aussi entrer en contact avec les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux formant la BBB (décrite plus bas). Pour atteindre le SNC et causer la méningite, *S. suis* doit traverser cette barrière.

Aucune étude n'est disponible sur les interactions entre *S. suis* et des cellules endothéliales de BBB porcines. Les seules données disponibles

proviennent d'études effectuées à l'aide de BMEC humaines (47, 351). Une de ces études (47) a démontré que *S. suis* adhère aux cellules endothéliales humaines des microvaisseaux cérébraux (BMEC). Cependant, à l'inverse des autres pathogènes causant la méningite (voir plus bas), l'invasion des cellules BMEC n'a pas été observée lorsque les bactéries étaient mises en contact avec les cellules, indépendamment du mode de déposition utilisé (apical ou basolatéral) (47). D'autres différences sont notables entre les interactions de *S. suis* avec les cellules épithéliales (26, 204) et endothéliales. Par exemple, les souches capsulées et non capsulées adhèrent à des niveaux similaires aux BMEC humaines (47). Par ailleurs, les souches hémolytiques sont toxiques pour les BMEC humaines tandis que les souches non-hémolytiques ne le sont pas (47). Cette toxicité est inhibée par l'addition d'anticorps dirigés contre la suilysine et celle de cholestérol liant la suilysine (47). De plus, par l'intermédiaire de la phospholipase C, la suilysine induit la sécrétion d'acide arachidonique de la membrane des BMEC humaines (182).

De plus, *S. suis* stimule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et les chimiokines IL-8 et MCP-1 par les BMEC humaines (351). Il est suggéré que cette sécrétion de médiateurs de l'inflammation pourrait induire une augmentation de la perméabilité de la BBB via le relâchement des jonctions intercellulaires serrées, en plus d'attirer des monocytes et des neutrophiles en quantité importante au site de l'inflammation, i.e. la BBB. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'activation des BMEC humaines pourrait être reliée à l'adhésion spécifique de *S. suis* à ces dernières. Ainsi, les cellules périphériques HUVEC auxquelles *S. suis* n'adhère quasiment pas ne sécrètent pas d'IL-6, IL-8 et MCP-1 à l'inverse des BMEC (351). De plus, l'activation transcriptionnelle de TLR2, CD14 et de cytokines inflammatoires dans les vaisseaux sanguins du cerveau de souris infectées par *S. suis* (86) confirme l'activation de ces cellules de la BBB dans le processus infectieux de *S. suis*.

Au contact des BMEC humaines *S. suis* acquiert une activité plasmine, grâce à l'urokinase produite par ces cellules et qui active le plasminogène lié au *S. suis*, ce qui pourrait faciliter la transmigration de *S. suis* au travers de la BBB (182)

Ainsi, bien que ces informations soient disponibles sur les interactions entre *S. suis* et des cellules endothéliales de BBB humaines, aucune information n'est disponible sur les interactions entre *S. suis* et leurs homologues porcines. Par conséquent, les mécanismes que *S. suis* utilise pour traverser la BBB chez le porc sont inconnus.

1.6.2.2) Cellules épithéliales porcines du plexus choroïde de la barrière sang-CSF

Le plexus choroïde est situé dans le système ventriculaire du cerveau. Il est composé des cellules épithéliales possédant des jonctions serrées et il forme la base structurale de la barrière sang-CSF. Cet épithélium sécrète le CSF, en plus de contenir un corps connectif relâché contenant des capillaires perméables et des cellules lymphoïdes. De plus, il est impliqué dans le maintien l'homéostasie du SNC par son contrôle de plusieurs échanges entre le sang et le CNS pour fournir au cerveau des nutriments et des hormones tout en permettant la sortie de composés toxiques ou de métabolites du cerveau. Finalement, la barrière participe aussi à la modulation neurohumorale du cerveau et aux interactions neuroimmunes (322).

S. suis affecte la fonction et l'intégrité de cette barrière formée par les cellules épithéliales porcines du plexus choroïde (CPEC) dans un modèle *in vitro* (334). Ainsi, Tenenbaum *et al.* ont démontré que certaines souches de *S. suis* provoquaient, lorsqu'elles étaient déposées de façon apicale sur la barrière de cellules, la diminution de la résistance transépithéliale et l'augmentation du passage paracellulaire du mannitol marqué (334). Cette propriété n'est pas exclusivement reliée à la suilysine. De plus, les souches hémolytiques vivantes de *S. suis* se sont montrées toxiques pour ces cellules, contrairement aux souches de *S. suis* soniquées ou inactivées par les rayons ultra-violet (UV) (334). Ces observations sont en accord avec les lésions observées au plexus choroïde lors de méningite chez des porcs infectés naturellement ou expérimentalement par *S. suis* (368, 369). En plus de la nécrose, *S. suis* avait aussi provoqué l'apoptose des CPEC (335). L'activation transcriptionnelle de TLR2, CD14 et cytokines

inflammatoires a été observée dans le plexus choroïde dans un modèle murin de méningite (86).

Ainsi, par tous ces effets, *S. suis* pourrait faciliter le passage de bactéries et de leucocytes par la barrière sang-CSF, bien que les mécanismes sous-jacents à ce bris de la barrière doivent encore être déterminés précisément. Une fois dans le CSF, *S. suis* pourrait survivre dans le CSF car cet environnement ne contient que très peu d'Ig et pas de composés du système du complément. Par contre, des CPEC stimulées avec l'interféron gamma et le TNF- α , peuvent inhiber la croissance de *S. suis*. Cette activité bactériostatique serait due à un manque d'un acide aminé essentiel, le L-tryptophane, dans le milieu des cellules causé par l'activation de l'indoleamine 2,3-dioxygénase chez ces cellules (5).

1.6.2.3) La théorie du cheval de Troie et la théorie modifiée

Les deux sections précédentes font état des interactions entre *S. suis* en tant que de bactérie libre avec deux barrières qui séparent le sang du cerveau. De son côté, la présente section apporte un troisième moyen potentiel pour la bactérie pour atteindre le SNC, non plus sous la forme de bactérie libre, mais en association avec des monocytes qui sont attirés au site de l'inflammation (BBB) et qui peuvent la traverser massivement la BBB dans des cas de méningites.

En 1990, Williams et Blakemore (367, 368) ont suggéré que la bactérie pourrait se servir des monocytes comme véhicule de transport pour se rendre au système nerveux central (SNC), ce qu'on appelle la théorie du cheval de Troie. Ainsi, et tel que mentionné dans la section 1.6.1.3, les bactéries pourraient être phagocytées par les monocytes, survivre à l'intérieur de ces cellules et atteindre le SNC (367, 368). Les auteurs ont rapporté également que des macrophages murins pouvaient phagocyter *S. suis in vitro* (en absence d'anticorps et de complément) (367). De plus, les souches non virulentes seraient tuées par les phagocytes contrairement aux souches virulentes qui survivraient et se répliqueraient à l'intérieur des phagocytes (théorie du cheval de Troie). Des études ultérieures ont indiqué que la bactérie voyage de façon extracellulaire, associée à la surface de monocytes (théorie du cheval de Troie modifiée) (295). Ainsi, les souches de *S.*

S. suis adhèrent plutôt à l'extérieur des macrophages murins sans être phagocytées (295, 300). Cette protection contre la phagocytose est médiée par la CPS qui inhibe le processus de signalisation menant à la phagocytose chez les macrophages murins (46, 296, 300, 307).

De plus, il a été démontré que *S. suis* augmentait la présence de molécules d'adhésion (ICAM-1, CD11a/CD18, CD11c/CD18) à la surface de monocytes humains ce qui a provoqué l'augmentation de l'adhésion de ces monocytes à des cellules endothéliales humaines (6). Par ailleurs, une des propriétés intéressantes de la CPS consiste à stimuler la production de prostaglandine E2 et de métalloprotéinase de matrice 9 (MMP-9) par des macrophages humains (183). Ces deux conséquences des interactions entre *S. suis* et des cellules phagocytaires pourraient l'aider à traverser et/ou à endommager la BBB.

Le modèle du cheval de Troie dans sa version originale ou modifiée permettrait à *S. suis* de provoquer une bactériémie persistante, de se disséminer dans l'organisme et d'éventuellement traverser la BBB. Par contre, ce sujet ne sera pas couvert dans cette revue de littérature.

2) Barrière hémato-méningée

La BBB est formée en partie des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (BMEC) qui forment l'endothélium des capillaires parcourant le cerveau (258) (Figure 1). Cet endothélium se caractérise par la présence de jonctions intercellulaires serrées (TJ) et de pericytes à l'intérieur de la membrane basale des capillaires et il est entouré d'un feuillet formé de terminaisons d'astrocytes (Figure 1) (258). Les pericytes assurent l'intégrité structurale et la genèse de la BBB (20). De leur côté, les terminaisons d'astrocytes participent à l'induction et au maintien des TJ (20).

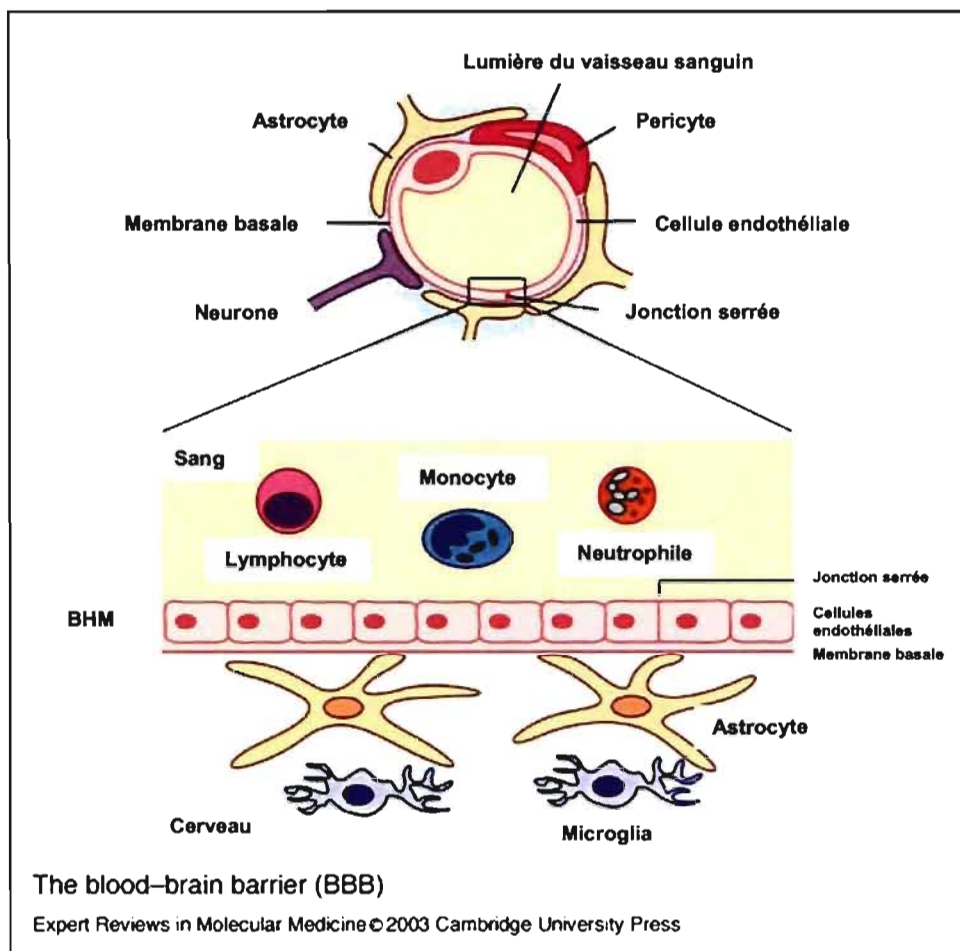


Figure 1 : La barrière hémato-méningée (BBB). Modifiée de Francis *et al.* (119)

Dans son rôle de gardienne de l'homéostasie au SNC, la BBB empêche la diffusion passive de la plupart des composés du sang vers le cerveau (170). D'ailleurs, un des défis majeurs de la pharmacologie moderne est de « désigner » des composés thérapeutiques ou diagnostiques capables de la traverser pour se rendre au cerveau.

Il ne s'agit cependant pas d'une barrière statique. Ainsi, elle maintient l'homéostasie au cerveau en régulant très strictement, i.e. en bloquant ou en permettant le passage des composés du sang vers le cerveau et vice versa. Très peu de pinocytose/transcytose se retrouvent au niveau de l'endothélium du cerveau, mais ce dernier possède des systèmes spécifiques pour l'endocytose favorisée par des récepteurs et par adsorption qui peuvent transférer certains peptides et lipoprotéines au cerveau (200). Plusieurs autres mécanismes

physiques et métaboliques entrent en jeu au niveau de la BBB et des mécanismes interviennent aux niveaux de la diffusion paracellulaire, la diffusion transcellulaire, des canaux à cations, des symports et antiports à ion, du transport actif par diffusion facilitée ou par antiport (259). La BBB bloque le mouvement de la plupart des molécules sauf celles qui traversent les membranes cellulaires par liposolubilité (ex. oxygène, dioxyde de carbone, éthanol et hormones stéroïdes) (143). Par ailleurs, certaines molécules (comme les sucres et certains acides aminés) profitent de systèmes de transport spécifiques. Par exemple, le glucose qui est la principale source d'énergie du cerveau est transporté par le transporteur GLUT-1 (85). De son côté, la P-glycoprotéine est un transporteur à efflux à large spécificité et maintient plusieurs molécules hydrophobiques et xénobiotiques (médicaments, antibiotiques) à l'extérieur du cerveau (348). En tant que barrière métabolique, la BBB possède plusieurs systèmes d'enzymes comme par exemple la monoamine oxydase qui entrave le passage d'agents neuro-actifs qui pourraient altérer le bon fonctionnement des synapses (3). Un mauvais fonctionnement ou un endommagement de la BBB a été décrit lors de plusieurs problèmes neurologiques tels que des accidents vasculaires cérébraux, l'épilepsie, la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer (37, 70).

Il existe par contre certaines régions du cerveau où la BBB n'est pas présente et où les vaisseaux sanguins sont perméables. Ce sont les organes circumventriculaires (organe subfornical, aire postrema, organum vasculosum de la lamina terminalis (OVLT), éminence médiane, neurohypophyse, glande pinéale). Le cerveau peut ainsi contrôler le taux de sécrétion d'hormones en permettant à ses neurones d'échantillonner le sang à ces endroits précis puisque les hormones ne traversent pas cette barrière (20).

2.1) Jonctions serrées

Les jonctions serrées (TJ) empêchent de façon sélective la diffusion de la plupart des substances provenant du sang vers le cerveau en les empêchant de passer entre les cellules endothéliales de la barrière (20, 200). Lorsque les TJ ne sont plus « étanches », la BBB devient dysfonctionnelle (20). Leur morphologie est plus similaire à celle des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales qu'à

celle des cellules endothéliales des vaisseaux périphériques (200). Les TJ sont responsables de la résistance électrique transendothéliales (TEER) et de la perméabilité paracellulaire diminuée de la BBB.

Les TJ forment un réseau continu de feuilletts intramembranaires de protéines parallèles, interconnectés et arrangés en une série de barrières multiples (Figure 2) (292) et sont composées de plusieurs protéines différentes. Les claudines, occludines et des protéines accessoires forment un support structural aux TJ (172). Les claudines établissent le squelette des TJ en formant des dimères avec les claudines des cellules adjacentes. Il existe plusieurs isoformes des claudines. Dans la BBB, on retrouve les claudines 1 et 5 (173). Pour leur part, les occludines ont un rôle régulateur et leur présence correspond à une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité paracellulaire (166). Les protéines zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3), cingulines, AF6 et 7H6 sont des protéines accessoires aux TJ (172, 200) (Figure 2). Les protéines ZO servent de protéines de reconnaissance pour le placement des TJ en plus de servir de support structural pour les protéines servant à la transduction des signaux. Elles se lient entre elles en plus de lier d'autres protéines accessoires comme AF6, 7H6 et les cingulines. De leur côté, les cingulines se lient aux protéines ZO à leur extrémité globulaire et à d'autres cingulines à leur seconde extrémité (69). Les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM), membres de la superfamille des Ig, font également partie des TJ. En association avec la molécule d'adhésion PECAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire endothéliale plaquettaire-1), les JAM régulent la migration des leucocytes (227). Les protéines ZO, les claudines et les occludines ont des sites de liaison à l'actine du cytosquelette des BMEC (176). De plus, plusieurs voies signalétiques sont impliquées dans la régulation des TJ et modulent des éléments du cytosquelette cellulaire (200). Ces voies signalétiques mettent en jeu des protéines G, des sérine, thréonine et des tyrosine kinases, des protéases, TNF- α et des variations des niveaux intra et extracellulaire de calcium et des niveaux d'AMP cyclique (200).

Les TJ font partie d'un complexe jonctionnel incluant les TJ et les jonctions adhérentes. Les TJ et les jonctions adhérentes (composées d'un système

cadhérine-caténine) communiquent entre elles par leurs composantes, ce qui suggère une interdépendance de ces deux types de jonctions (200).

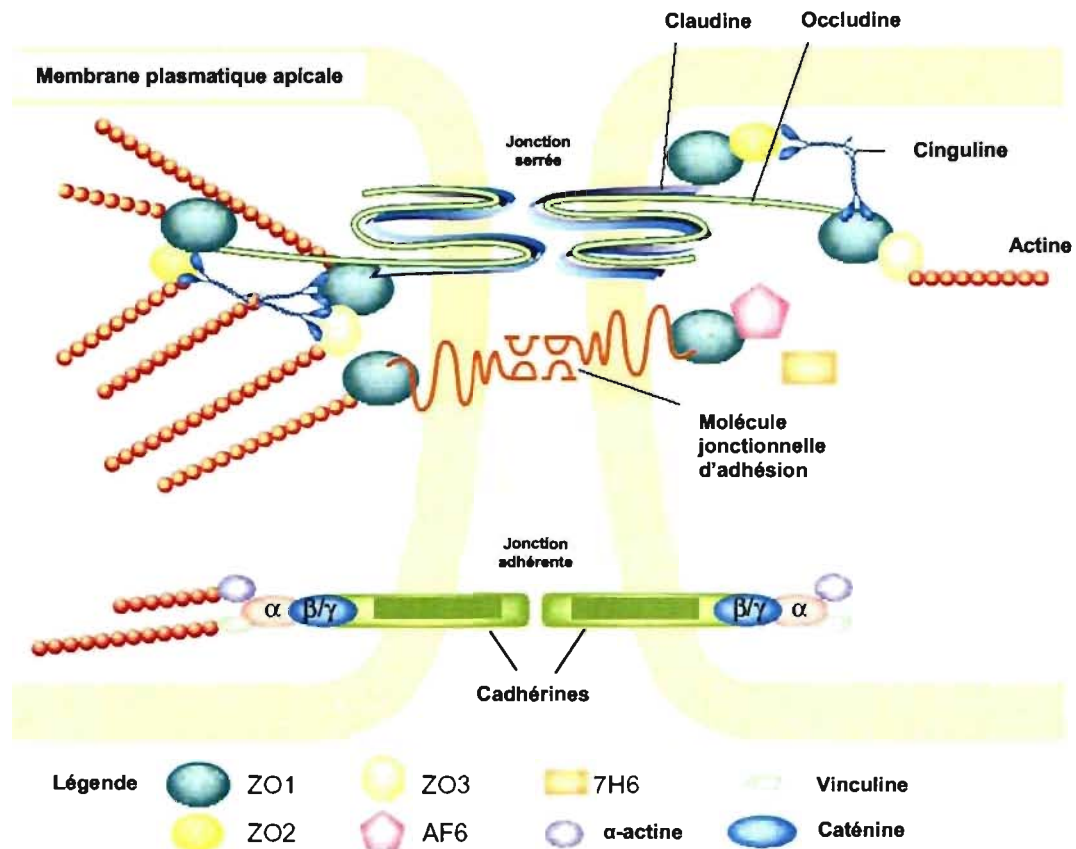


Figure 2: La structure des jonctions serrées. Tirée de Huber *et al.* (172)

2.2) En conditions d'inflammation

Lors d'une infection, la BBB protège le cerveau de la plupart des pathogènes circulant dans le sang, ce qui rend les infections atteignant le cerveau très rares. Par contre, les infections au cerveau sont graves et difficiles à traiter. Dans des conditions physiologiques normales, la BBB agit comme une barrière pour le système immunitaire en limitant l'entrée des leucocytes (235). Dans des conditions d'inflammation (ex. infection par un pathogène), la BBB est exposée aux pathogènes, aux substances produites par ces pathogènes et aux molécules actives de la réponse inflammatoire de l'hôte (165). Dans ces conditions

d'inflammation, la BBB est donc capable de modifier son architecture pour augmenter sa perméabilité tout en conservant son intégrité structurale. Ceci lui permet de protéger le cerveau et de maintenir l'homéostasie (173). Ainsi, plusieurs médiateurs (cytokines, « reactive oxygen species » et eicosanoïdes) peuvent induire l'augmentation rapide de l'expression de molécules d'adhésion (PECAM-1, E-sélectine, ICAM-1) (318), agir comme molécules chimioattractantes pour l'augmentation de la migration des leucocytes ou même altérer les fonctions de la BBB. De plus, différentes molécules telles que certaines cytokines vasoactives (TNF- α , IL-1 β , interféron- γ) et la chimiokine MCP-1 et des facteurs de croissance (363) peuvent réguler des TJ en provoquant une augmentation de la perméabilité de la BBB (315). Par contre, en conditions extrêmes ou prolongées, les différentes molécules formant les TJ peuvent se séparer et entraîner la formation d'œdème et de dommages au cerveau (165). La migration amplifiée des leucocytes pourrait endommager l'organisation des TJ en brisant les liens occludine-ZO1 (71).

3) Mécanismes de transmigration à travers la BBB

Plusieurs pathogènes peuvent traverser la BBB incluant des bactéries, des virus, des mycètes et des parasites. Parmi le club sélect des bactéries capables de traverser la BBB, on retrouve *Escherichia coli* K1 (320), *Streptococcus pneumoniae* (280), les streptocoques du groupe B (246), *Listeria monocytogenes* (291), *Citrobacter freundii* (19), *Borrelia burgdorferi* (325), *Haemophilus parasuis* (354), *Haemophilus influenzae* (360), *Neisseria meningitidis* (312).

Le passage au travers de la BBB de ces pathogènes est le résultat d'un processus complexe et très peu élucidé entre les produits des gènes bactériens et les cellules endothéliales. Il est à noter que les cellules endothéliales ne sont pas des cellules phagocytaires professionnelles i.e. qu'elles n'ingèrent pas de pathogènes normalement. Parmi les stratégies que ces pathogènes ont développées, on compte des mécanismes de passage direct tels que l'invasion paracellulaire (entre les cellules) et l'invasion transcellulaire (au travers des cellules), en plus de l'altération des cellules (par une toxicité ou des toxines) et le mécanisme du cheval de Troie. En général (ceci n'inclut pas exclusivement les cellules endothéliales), l'invasion transcellulaire peut impliquer un mécanisme à

fermeture éclair dépendant de la clathrine (356) (incluant un contact direct entre un ligand bactérien et un récepteur cellulaire ainsi que la formation d'une vacuole) ou un mécanisme induit (« trigger mechanism ») suite à l'injection de protéines à l'intérieur de la cellule hôte menant à la formation de protusions membranaires par cette dernière (11).

4) Les pathogènes traversant la BBB

4.1) *Escherichia coli* K1

Escherichia coli K1 est le modèle par excellence de l'invasion transcellulaire des BMEC (197, 384). Cette bactérie à Gram négatif cause la méningite néonatale chez l'humain avec des taux élevés de morbidité et de mortalité.

La participation de plusieurs protéines et/ou structures d'*E. coli* à l'invasion des BMEC humaines et au passage de la BBB a été décrite. Parmi elles, on compte les protéines Ibe (IbeA, IbeB, IbeC, IbeT), AslA, YijP, OmpA, PilC, InlB, TraJ, CNF1 et les fimbriae de type 1 (FimH) (170, 197, 384, 389). La translocation de *E. coli* au travers de la BBB est le résultat d'interactions spécifiques entre *E. coli* et les BMEC humaines. Ainsi, les protéines et/ou structures bactériennes lient des récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes. La toxine CNF1 adhère avec un récepteur de la laminine (53), la protéine externe OmpA se lie avec la glycoprotéine Gp96 (271), l'adhésine FimH cible des protéines mannosylées (290), tandis que les protéines Ibe interagissent avec des protéines de 45 kDa (270). Suite à la liaison entre ces différentes protéines/structures avec les récepteurs spécifiques, on assiste à un réarrangement du cytosquelette d'actine (279) et à l'activation des molécules signalétiques reliées à ce réarrangement. Ainsi, l'interaction de FimH, OmpA et des protéines Ibe entraîne l'activation de la kinase à adhésion focale (KAF). La phosphorylation de la tyrosine de la KAF entraîne la phosphorylation de la paxilline et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). Dans le cas de la toxine CNF1, son interaction avec le récepteur de la laminine active les RhoGTPases et par la suite, la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) et l'ezrine, ce qui induit la formation des protusions de membrane ressemblant à des microvilli. Une fois à l'intérieur des BMEC, *E. coli* K1 est retrouvé à l'intérieur de vacuoles liées à la membrane et il module, grâce à sa capsule, le trafic intracellulaire pour

éviter la fusion avec le lysosome. Il ressortira du côté basal de la monocouche en tant que bactérie vivante (197, 384).

4.2) *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae est une des causes majeures de la méningite chez l'homme adulte. *S. pneumoniae* a la capacité d'envahir une monocouche de BMEC humaines et de rat (281) et de la traverser (transcytose) à l'intérieur de vacuoles, mais sans multiplication intracytoplasmique (276).

Un des récepteurs visés par *S. pneumoniae* sur les BMEC est le récepteur du facteur activateur des plaquettes (PAF) (281) en association avec la beta-arrestine-1, tel que démontré par leur co-localisation (276). Les données obtenues dans l'étude de Ring *et al.* (281) suggèrent que suite à son interaction avec ce récepteur, *S. pneumoniae* envahit la cellule et on assiste à la transcytose de la bactérie. Par contre, lorsque la bactérie ne passe pas par le récepteur PAF, on assiste à un phénomène de recyclage de la bactérie qui entre et ressort du côté apical d'où elle était entrée. L'observation des bactéries à l'intérieur des BMEC a permis de démontrer que les vacuoles contenant ces bactéries sont recouvertes de clathrine et que la moitié de ces vacuoles empruntaient la voie classique vers le lysosome et que l'expression de la beta-arrestine semblait interférer avec cette voie (276).

La mise en contact des BMEC primaires de rat avec la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* stimule l'expression de TNF- α , la synthase d'oxyde nitrique inducible (iNOS) et ICAM-1 (121). De plus, le traitement des BMEC avec *S. pneumoniae* les stimule aussi à sécréter plus de MMP-2 (gélatinase A), mais pas de MMP-9 (gélatinase B) (234), ce qui pourrait contribuer à affaiblir la barrière cellulaire.

Une étude de Pracht *et al.* a suggéré que le facteur d'adhérence et de virulence pneumococcal A (PavA) affecte plutôt la colonisation des BMEC humaines par *S. pneumoniae* en modulant l'expression ou la fonction d'importants facteurs inconnus impliqués dans la virulence de *S. pneumoniae* (269), plutôt que d'y être impliqué directement.

S. pneumoniae induit deux formes morphologiquement distinctes de mort cellulaire programmée chez les cellules endothéliales dérivées du cerveau (30). Ainsi, la paroi cellulaire, une composante pro-inflammatoire majeure, utilise le TLR2 pour causer une apoptose classique impliquant les caspases (30). De leur côté, les bactéries entières, la pneumolysine et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) causent une apoptose indépendante des caspases, de TLR2 et de TLR4.

La pneumolysine de *S. pneumoniae* est toxique pour les BMEC humaines et bovines (390). Un mutant déficient en pneumolysine n'affecte pas les barrières formées par ces cellules, alors que sa souche parentale et la pneumolysine purifiée provoquent le détachement et l'arrondissement des BMEC humaines en plus de baisser la TEER chez les BMEC bovines (390). Le détachement des cellules dépend de la synthèse de protéines *de novo* et requiert l'activité des caspases et des tyrosine kinases. De son côté, la paroi cellulaire de *S. pneumoniae* ne démontre aucun effet toxique sur les BMEC humaines et bovines. Ainsi, *S. pneumoniae* pourrait utiliser sa pneumolysine pour endommager la BBB.

4.3) Streptococcus du groupe B

Les streptocoques du groupe B (GBS) sont une cause majeure de méningite, de septicémie et de pneumonie chez les nouveaux-nés. Les GBS peuvent traverser la BBB par transcytose ou par le bris de la BBB. En 1997, Nizet *et al.* (246) ont démontré par microscopie électronique et par des tests de protection à la gentamicine que les GBS pouvaient envahir les BMEC humaines. La transcytose a également été démontrée en utilisant des monocouches de cellules cultivées dans des puits « transwell » (246). Dans cette étude, il est rapporté que les GBS peuvent survivre jusqu'à 20 h à l'intérieur des BMEC sans réplication intracellulaire apparente et qu'il est retrouvé à l'intérieur de vacuoles liées à la membrane (246). Cette invasion requiert la synthèse bactérienne active d'ADN, d'ARN et de protéines, ainsi que la réorganisation des microfilaments et des microtubules du cytosquelette eucaryote (246).

À forte dose, les GBS causent des dommages aux BMEC au moyen de leur toxine beta-hémolysine/cytolysine, un de leurs facteurs de virulence (246). Dans

un modèle murin, un mutant dépourvu de cette toxine cause un taux de mortalité plus faible et révèle une charge bactérienne plus faible au niveau du cerveau comparativement à la souche sauvage de la même espèce (90).

La capsule d'exopolysaccharides des GBS est un important facteur de virulence qui interfère avec l'invasion des BMEC humaines. Ainsi les GBS capsulés envahissent moins les BMEC qu'un mutant non-capsulé (47, 246). Cependant, elle ne semble pas interférer avec le niveau d'adhésion aux BMEC (47). L'acide lipotéichoïque (LTA) est un important facteur pour l'invasion par GBS des BMEC humaines. Lorsque le LTA n'est pas ancré dans la membrane et relâché dans le milieu, comme c'est le cas chez un mutant pour le gène *iagA* codant pour une glycosyltransférase, l'entrée des GBS est diminuée (89). De plus, la virulence d'un tel mutant chez la souris est atténuée puisqu'il cause un faible taux de mortalité et un développement de méningite moindre (89).

Les GBS et leur toxine beta-hémolysine/cytolysine provoquent également l'expression de plusieurs gènes chez les BMEC humaines tels que IL-8, Gro α , Gro β , IL-6, GM-CSF et ICAM-1 qui sont impliqués dans le recrutement et l'activation des neutrophiles et de leur migration au travers d'une monocouche formée de BMEC humaines (90). Des études utilisant un mutant sans toxine beta-hémolysine/cytolysine ou du surnageant de culture contenant cette dernière, ont montré que c'est elle qui serait la principale composante responsable de cette activation.

4.4) *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un pathogène intracellulaire facultatif causant des méningoencéphalites et des abcès au cerveau. Il adhère et envahit les BMEC humaines (372) et son invasion nécessite un réarrangement de l'actine du cytosquelette (372). Cette invasion est fortement inhibée par un sérum humain d'adulte contenant des anticorps spécifiques à *L. monocytogenes* (153).

L'invasion des BMEC est dépendante de l'adhésine bactérienne InlB, bien que l'adhésion initiale ne le soit pas et elle est accompagnée de multiplication intracellulaire, du mouvement et de la production de protusions contenant des

bactéries (141). Ces protusions servent au passage de *L.monocytogenes* d'une cellule infectée à une autre. Par ailleurs, au contact de *L. monocytogenes*, les BMEC humaines expriment plusieurs molécules d'adhésion telles que l'E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1). De plus, *L. monocytogenes* survit à l'intérieur de plusieurs types de cellules phagocytaires, ce qui pourrait lui permettre d'atteindre le SNC (96, 186, 372).

4.5) *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi est un des agents étiologiques de la maladie de Lyme caractérisée par une méningoencéphalite. *B. burgdorferi* adhère aux BMEC humaines, mais plutôt à leurs extrémités (138). Son passage au travers de la BBB n'affecte pas l'intégrité de la monocouche de cellules puisque la mesure de la TEER reste stable, ce qui suggère que *B. burgdorferi* utiliserait une route paracellulaire pour traverser la BBB. Par ailleurs, son passage provoquerait l'expression d'activateurs et de récepteurs de plasminogène, ainsi que des métalloprotéinases matricielles (138), ce qui pourrait mener à une dégradation focale et transitoire des protéines de jonctions serrées facilitant ainsi le passage des agents infectieux.

4.6) *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii (19) cause des méningites néonatales et est souvent associé à la formation d'abcès cérébraux. Il a été rapporté que *C. freundii* était capable d'envahir les BMEC humaines, de s'y répliquer et de traverser une barrière formée par ces cellules dans un modèle *in vitro*. L'invasion des BMEC humaines par *C. freundii* dépend des microfilaments, des microtubules, de l'acidification des endosomes et de la synthèse *de novo* de protéines (19).

4.7) *Haemophilus parasuis*

Haemophilus parasuis cause la maladie de Glässer chez le porc en plus de causer la méningite, la pneumonie et la polysérosite (254). Récemment, l'adhésion, l'invasion transcellulaire des BMEC porcines et la survie intracellulaire (jusqu'à 6h et donc probablement transitoire) d'*H. parasuis* ont été démontrées (354). *H.*

parasuis adhère aux BMEC porcines très rapidement et à des niveaux élevés. L'invasion d'*H. parasuis* requiert le réarrangement des microfilaments d'actine et des éléments cytosquelettiques microtubulaires, mais pas la synthèse bactérienne active d'ADN, d'ARN ou de protéines. De plus, des invasines de nature protéique ne semblent pas jouer un rôle important pour cette invasion des BMEC porcines. Par ailleurs, *H. parasuis*, même à de fortes concentrations d'inoculum, ne cause pas de toxicité envers les BMEC porcines (354).

4.8) *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae de type b cause la méningite et la pneumonie pouvant s'avérer fatales chez de jeunes enfants. Il cause une cytotoxicité élevée envers les cellules endothéliales bovines du cerveau et cette toxicité est due à son lipopolysaccharide (LPS) puisqu'elle est totalement bloquée par l'ajout de polymyxine B (261). Cependant, cette toxicité n'est mise en évidence qu'en présence de sérum (261). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le CD14 inhibe totalement cette toxicité indiquant ainsi que le CD14 est la composante du sérum responsable de l'activité du LPS sur ces cellules (261). En utilisant un modèle *in vitro* composé de cellules primaires de microvaisseaux cérébraux de rat, une étude de Tunkel *et al.* (346) a démontré que le LPS augmente le passage de l'albumine au travers de la barrière formée par ces cellules sans toutefois observer de mort cellulaire (test de LDH). De plus, l'inoculation intracisternale du LPS de *H. influenzae* dans un modèle de méningite chez le rat adulte (377) a provoqué une augmentation de la perméabilité de la BBB dépendante de la dose de LPS utilisée.

4.9) *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis cause la méningite chez l'humain. Il envahit les BMEC humaines sous sa forme capsulée (350). Cette entrée dépend de la présence de la fibronectine contenue dans le sérum humain qui sert de pont entre la protéine membranaire Opc et les récepteurs intégrine alpha5 beta1 (350). De plus, elle active la voie des JNK (c-Jun N-terminal kinases). Des méningocoques, seuls ou en groupe, sont observés à l'intérieur de compartiments liés à la

membrane (350). Les vacuoles contenant les bactéries interagissent avec la voie endocytaire puisqu'elles acquièrent des marqueurs endosomaux (245). Les bactéries encapsulées survivent à l'intérieur des BMEC humaines et s'y répliquent (245). Cette survie est liée à la capsule, puisqu'un mutant n'en produisant pas y est tué. De plus, *N. meningitidis* induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les BMEC humaines et cette activation est reliée à la voie des MAP (mitogen-activated) kinases p38 (350). L'utilisation de micropuces à ADN complémentaire correspondant à 11 835 gènes (oligonucléotides) humains sélectionnés a permis d'identifier les gènes des BMEC humaines dont l'expression était altérée suite au contact avec *N. meningitidis* (293). Parmi eux, des gènes codant pour des protéines d'adhésion cellulaires (CD44, CD98, et CD99), des gènes impliqués dans le signal subséquent aux intégrines, des régulateurs négatifs de ces voies et des gènes impliqués dans la réorganisation du cytosquelette ont été identifiés. Par ailleurs, *N. meningitidis* induit l'expression de NO synthase type II (NOS-2) et la production de nitrites chez des BMEC murines (67). La production de NO a entraîné la mort des cellules endothéliales (67). Les récepteurs TLR2 et TLR4 sont impliqués dans la réponse en NOS-2 suite au contact avec la bactérie (67).

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article I

Invasion of Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells by *Streptococcus suis* Serotype 2

Ghyslaine Vanier¹, Mariela Segura¹, Peter Friedl², Sonia Lacouture¹, and
Marcelo Gottschalk^{1*}

*Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de
médecine vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada¹ and Institute für
Biochemie, Technische Hochschule Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287
Darmstadt, Germany²*

Infection and Immunity. 2004. 72: 1441-1449

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé activement à la conception et au design expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Streptococcus suis is an important swine pathogen that mainly causes meningitis and occasionally causes other infections, such as endocarditis, arthritis, and pneumonia. The pathogenesis of *S. suis* infection has not been completely defined. However, in order to cause meningitis, *S. suis* has to cross the blood-brain barrier (BBB) made up of brain microvascular endothelial cells. The objective of this work was to study the interactions of *S. suis* serotype 2 with porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC). The ability of North American and European *S. suis* serotype 2 strains to adhere to PBMEC and, most importantly, to invade PBMEC was demonstrated by using an antibiotic protection assay and was confirmed by electron microscopy. The polysaccharide capsule of *S. suis* seemed to partially interfere with the adhesion and invasion abilities of the bacterium. Our results showed that intracellular viable *S. suis* could be found in PBMEC up to 7 h after antibiotic treatment. Inhibition studies demonstrated that invasion of PBMEC by *S. suis* required actin microfilaments but not microtubular cytoskeletal elements or active bacterial RNA or protein synthesis. At high bacterial doses, suilysin-positive strains were toxic for PBMEC. The role of suilysin in cytotoxicity was confirmed by using purified suilysin, electron microscopy, and the lack of toxicity of a suilysin-negative mutant. In swine, the invasion of endothelial cells of the BBB could play an important role in the pathogenesis of the meningitis caused by *S. suis*.

INTRODUCTION

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine pathogen that mainly causes meningitis and occasionally causes other infections, such as endocarditis, arthritis, and pneumonia (21). Of the 35 serotypes described, serotype 2 is the serotype that is most frequently associated with disease. This organism is also recognized as a zoonotic agent (2). Knowledge concerning the virulence factors of *S. suis* is still limited. Several molecules have been suggested to be virulence factors; these molecules include the capsule polysaccharide (CPS), a hemolysin (sullysin) (19, 27), a 136-kDa muramidase-released protein (MRP), and a 110-kDa extracellular factor (EF) protein (52). Recently, it has been proposed that a fibronectin- and fibrinogen-binding protein plays a role in the colonization of affected organs after experimental infection (13). So far, the CPS is the only proven critical virulence factor since unencapsulated isogenic mutants were shown to be completely avirulent and rapidly cleared from the circulation in both pig and mouse models of infection (8, 45). The CPS is composed of five different sugars, rhamnose, galactose, glucose, *N*-acetylglucosamine, and *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid), and it defines the serotype (15). However, natural nonvirulent *S. suis* serotype 2 strains are also encapsulated and have an amount of sialic acid in the CPS similar to the amount found in virulent strains (9). On the other hand, sullysin, MRP, and EF protein have been associated with the virulent phenotype of European strains, but they are absent in most virulent North American strains (11, 17, 41). While the role of MRP and EF protein is unknown (46, 47), sullysin is involved in cytotoxic effects for several types of cells, including epithelial, endothelial, and phagocytic cells (10, 29, 35, 42, 43). This hemolysin belongs to the family of cholesterolbinding toxins with a multihit mechanism of action (19). It has also been suggested that the pathogenesis of the infection caused by sullysin-positive strains and the pathogenesis of the infection caused by sullysin-negative strains may be different (18).

The pathogenesis of *S. suis* infection is not fully understood, and many steps are probably involved in this process. In order to reach the central nervous system (CNS) and cause meningitis, circulating *S. suis* has to cross the blood-

brain barrier (BBB). This barrier is responsible for maintaining the homeostasis within the CNS and is characterized by tight intercellular junctions that regulate the movement of cells, solutes, and macromolecules across the BBB (26, 50). The BBB is composed of the brain microvascular endothelial cells (BMEC), which are closely associated with pericytes and outgrowths of astrocytes (the so-called astrocytic end feet), as well as the epithelial cells of the choroid plexus (26). The primary site of breakdown of the BBB in most bacterial meningitis appears to be the BMEC (49). However, it is not clear how circulating *S. suis* cells cross the BBB. Moreover, *S. suis* serotype 2 has been shown to adhere to and activate human BMEC (10, 51), but unlike other meningeal pathogens, such as *Escherichia coli* K1, *Streptococcus pneumoniae*, and group B *Streptococcus* (GBS), invasion does not happen in this model (25, 50). Interestingly, it has been shown that the capacities of adhesion and invasion by *E. coli* K1 (36) and GBS (29) varied for different types of endothelial and epithelial cells, respectively, suggesting that there are cell-specific interactions. In this regard, the adhesion of *S. suis* seems to be specific for certain cell types since the organism does not significantly adhere to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (10). In an attempt to further understand the pathogenesis of meningitis caused *S. suis* in swine, the objective of this study was to evaluate the ability of *S. suis* serotype 2 to adhere to, invade, and damage porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *S. suis* serotype 2 suilysin-positive MRP⁺EF⁺virulent strain 31533 (28) was used as the reference strain in this study. In selected experiments, *S. suis* serotype 2 suilysin-negative MRP⁺EF⁺virulent strain 89-1591 was used. Both of these strains have previously been used in studies with human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) (10). Two isogenic mutants derived from strain 31533, suilysin-negative mutant SX911 obtained by allelic replacement (kindly provided by P. Willson, Veterinary Infectious Disease Organization, Saskatoon, Canada) (30) and unencapsulated mutant B218 obtained in our laboratory by allelic exchange and corresponding to a transposon-derived mutant described previously (8), were also used in this study. *S. suis*

isolates used in comparative toxicity studies are listed in Table 1. Bacteria were grown overnight on sheep blood agar plates at 37°C, and isolated colonies were used as inocula for Todd-Hewitt broth (THB) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), which was incubated for 8 h at 37°C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 µl of 10⁻³ dilutions of the cultures into 30 ml of THB and incubating the cultures for 16 h at 37°C with agitation. Stationary-phase bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.3) and were appropriately diluted in cell culture medium before infection (see Results). The number of CFU per milliliter in the final suspension was determined by plating samples onto THB agar. Encapsulated GBS type III strain COH1 (kindly provided by C. Rubens, Children's Hospital and Regional Medical Center, Seattle, Wash.) was used in selected experiments for comparison purposes. In addition, *Streptococcus gordonii* strain Challis was used as a negative control (10, 34). *S. suis* mutant SX911 was grown in the presence of 200 mg of spectinomycin (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) per ml.

Cell culture. The PBMEC line PBMEC/C1-2 was previously immortalized by lipofection with pRNS-1 encoding the small and large T-antigens of simian virus 40 and was shown to maintain its morphological and functional characteristics (48). Cells were grown in complete IF medium, which is a 1:1 mixture of Iscove's modified Dulbecco's medium and Ham's F-12 medium (Gibco, Burlington, Vt.) supplemented with 7.5% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin-streptomycin (Gibco), sodium bicarbonate, L-glutamine, human transferrin (ICN Biomedical Inc., Aurora, Ohio), N-acetyl-cysteine, hypoxanthine, porcine heparin, human recombinant fibroblast growth factor-basic (Sigma), and β-mercaptoethanol (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). Flasks (Falcon; Becton Dickinson, Bedford, Mass.) and Primaria 96- and 24-well tissue culture plates (Falcon) were precoated with type A gelatin (1%) from porcine skin (Sigma) to support the cells. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humid atmosphere and were used before passage 20 for all experiments. For assays, cells were trypsinized by adding a 0.05% trypsin–0.03% EDTA solution (Gibco) and were diluted in culture medium to obtain a concentration of 8 X 10⁴ cells/ml, and the suspension was distributed into tissue culture plates and incubated until

confluence was reached (48 h). Just before the experiments, the medium was removed from the plates and was replaced by medium without antibiotics.

PBMEC invasion and adhesion assays. The invasion assay was performed as previously described (10, 34), with some modifications. Stationary-phase bacteria were pelleted, washed twice with PBS, and resuspended in fresh cell culture medium without antibiotics at different concentrations (see Results). Confluent monolayers of PBMEC grown in 24-well plates were infected with 1-ml aliquots of a bacterial suspension. The plates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min to bring the bacteria to the surface of the monolayer and incubated for different times at 37°C with 5% CO_2 to allow cell invasion by the bacteria. The monolayers were then washed twice with PBS, and 1 ml of cell culture medium containing 100 μg of gentamicin per ml and 5 μg of penicillin G (Sigma) per ml was added to each well. The plates were then incubated for 1 h at 37°C with 5% CO_2 to kill extracellular and surface-adherent bacteria. The monolayers were washed three times with PBS and incubated for 10 min at 37°C in the presence of 200 μl of 0.05% trypsin–0.03% EDTA. After this incubation period, 800 μl of ice-cold deionized water was added, and the cells were disrupted by scrapping the bottom of the well and by repeated pipetting to liberate intracellular bacteria. Serial dilutions of the cell lysate were plated onto THB agar and incubated overnight at 37°C . To confirm that 100% of the extracellular bacteria were killed after the antibiotic treatment, a 100- μl sample of the last PBS wash solution was plated on THB agar (data not shown). Levels of invasion were expressed as the total number of CFU recovered per well. An adhesion assay to quantify the total cell-associated bacteria (intracellular bacteria plus surface-adherent bacteria) was performed like the invasion assay, but the cells were vigorously washed five times to eliminate nonspecific bacterial attachment and no antibiotic treatment to kill the extracellular bacteria was used. The levels of adhesion were expressed as the total number of CFU recovered per well.

Intracellular survival assay. An invasion assay was performed as described above, except that after a 2-h invasion period, the initial gentamicin-penicillin G treatment was lengthened for different times up to 7 h. To ensure that

the number of intracellular bacteria was not affected by the entry of antibiotics during the incubation period, some experiments were performed by reducing the antibiotic concentrations to 25 µg of gentamicin per ml and 1.25 µg of penicillin G per ml after an initial incubation for 1 h in the presence of 100 µg of gentamicin per ml and 5 µg of penicillin G per ml. The data were expressed as the total number of CFU recovered per well after antibiotic treatment.

Invasion inhibition studies. For experiments to test the effects of bacterial RNA and protein synthesis inhibitors, bacteria were pretreated with rifampin and tetracycline (Sigma), respectively. *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/ml) was treated with the appropriate concentration of inhibitor at 37°C for 30 min prior to infection, as well as during the 2-h invasion period. The MICs (determined by using NCCLS recommendations) for strain 31533 were 0.03 µg/ml for rifampin and 1.0 µg/ml for tetracycline. In addition to MICs, concentrations that were one-half and two times the MICs were also used for each antibiotic. For experiments in which the effects of microfilament and microtubule formation inhibitors were tested, PBMEC monolayers were preincubated with cytochalasin D and colchicine (Sigma), respectively. Different concentrations of the inhibitors were added at 37°C for 30 min prior to infection with strain 31533 (10^6 CFU/ml), as well as during the 2-h invasion period. Cytochalasin D concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 µg/ml and colchicine concentrations of 0.5, 1.0, 5.0, 10, and 20 µg/ml were used. The results were expressed as the percentage of invasion relative to the level of invasion without inhibitor (considered 100% invasion).

PBMEC cytotoxicity assay. The cytotoxic effects of bacteria were evaluated by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme as previously described (34), with some modifications. Briefly, bacteria were grown and diluted as described above, and cells grown in 96-well plates were infected with 100-µl aliquots of a bacterial suspension at different concentrations. The plates were centrifuged at 800 x *g* for 10 min to bring the bacteria to the surface of each monolayer and were then incubated for different times at 37°C with 5% CO₂. Noninfected cells and bacteria in IF medium without a PBMEC monolayer were used as negative controls, whereas cells lysed in 0.025% Triton X-100 were used

as positive controls (100% toxicity). At the end of the incubation period, a 50- μ l aliquot of each supernatant was transferred to a 96-well plate, which was centrifuged at 2,300 $\times g$ for 20 min to pellet the bacteria. LDH was measured by using 20- μ l aliquots of each centrifuged supernatant and a miniaturized version of the Sigma colorimetric assay as described by Nizet et al. (33). The percentage of cytotoxicity was calculated as follows: $[(\text{sample OD}_{414} - \text{OD}_{0\%}) / (\text{OD}_{100\%} - \text{OD}_{0\%})] \times 100$, where sample OD_{414} is the optical density at 414 nm of the sample, $\text{OD}_{0\%}$ is the optical density at 414 nm of noninfected cells, and $\text{OD}_{100\%}$ is the optical density at 414 nm of Triton X-100-lysed cells. Purified suliyisin (kindly provided by T. Jacobs, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands) was also evaluated at different concentrations (1 to 5 $\mu\text{g/ml}$) in cell medium without antibiotics. The suliyisin was reactivated by addition of 2-mercaptoethanol (1%) to the culture medium during the assay (27). In parallel, 2-mercaptoethanol (1%) was added to the culture medium to ensure that it was not toxic to cells (data not shown).

Electron microscopy studies. For transmission electron microscopy (TEM), PBMEC monolayers were grown on 13-mm Thermanox coverslips in a 24-well culture plate. Invasion, adhesion, and cytotoxicity assays were performed as described above. After two washes with PBS, the monolayers were fixed for 1 h at room temperature with 2% (vol/vol) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3), and then samples were postfixes in 2% (vol/vol) osmium tetroxide in deionized water. Specimens were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in firm Spurr resin. Thin sections were cut with a diamond knife by using a Leica Ultracut ultramicrotome and were poststained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed with a model 420 electron microscope (Philips Electronics). For scanning electron microscopy (SEM), samples were processed like the samples for TEM were processed, except that they were not postfixes with osmium tetroxide. Samples for SEM were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and covered with gold after critical point drying and were examined with a Hitachi S-3000N microscope.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm standard deviations. Data were analyzed by a two-tailed, unpaired *t* test. A *P* value of <0.05 was considered significant. All assays were repeated at least three times.

RESULTS

Some *S. suis* strains can damage PBMEC. In order to determine if *S. suis* could be cytotoxic to PBMEC, LDH release measurements were obtained. As shown in Table 1, all suilysin-producing strains were toxic for PBMEC, while suilysin-negative strains were not toxic. In addition, suilysin-negative mutant SX911 was not toxic, in contrast to its parental strain 31533. The role of suilysin was confirmed by adding the purified hemolysin at a concentration of 1 to 5 $\mu\text{g/ml}$ to cells. Suilysin injured PBMEC in a concentration-dependent manner, and the highest toxicity observed occurred at a concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ ($97\% \pm 4\%$). Kinetic studies showed that suilysin-positive strain 31533 injured PBMEC in a time-dependent manner (Fig. 1A). In contrast, suilysin-negative strain 89-1591 was not cytotoxic during the same period. As shown in Fig. 1B, cytotoxicity caused by suilysin-positive strain 31533 after 4 h of incubation was concentration dependent, while suilysin-negative strain 89-1591 remained noncytotoxic even at a concentration of 10^8 CFU/ml. However, it should be noted that the levels of cytotoxicity of both strains (Fig. 1B) were very low and similar at concentrations ranging from 10^4 to 10^7 CFU/ml ($P > 0.05$). At a concentration of 10^8 CFU/ml, the level of cytotoxicity due to suilysin-positive strain 31533 was significantly higher than the levels of cytotoxicity due to mutant SX911 and strain 89-1591 ($P < 0.001$). Interestingly, similar levels of toxicity were obtained with the unencapsulated mutant B218 and its parental strain 31533 ($P > 0.05$), indicating that there was no additive toxic effect due to surface-exposed cell wall components. TEM was used to confirm the toxicity of suilysin-positive strain 31533 to PBMEC (Fig. 2C). Injury was manifested by a loss of cell membrane integrity and by disappearance of the nucleus. The PBMEC integrity after 2 h of incubation with strain 89-1591 (Fig. 2B) was comparable to the integrity of noninfected control cells (Fig. 2A). In the context of these results, the bacterial concentration used for adhesion and invasion assays (10^6 CFU/ml) was not toxic to cells.

TABLE 1. Cytotoxicities of different *S. suis* serotype 2 strains for PBMEC, as determined by measurement of LDH release^a

Strain	Geographic origin or type	Suilysin production	Cytotoxicity (%)
89-1591	Canada	—	6 ± 5
90-1330	Canada	—	4 ± 5
98-B575	Canada	—	5 ± 7
98-B099	Canada	—	1 ± 3
98-8993	Canada	—	0 ± 0
94-623	France	—	3 ± 4
SX332	United States	+	96 ± 4
95-8242	Canada	+	74 ± 14
166'	France	+	91 ± 8
31533 ^b	France	+	53 ± 17
B218	Mutant ^c	+	72 ± 12
SX911	Mutant ^c	—	0 ± 0

^a The cytotoxicity assay was performed by measuring LDH release after 4 h of incubation in the presence of *S. suis* (10⁸ CFU/ml).

^b Reference strain used in this study.

^c The isogenic unencapsulated mutant B218 and the isogenic suilysin-negative mutant SX911 were derived from *S. suis* strain 31533 by allelic exchange.

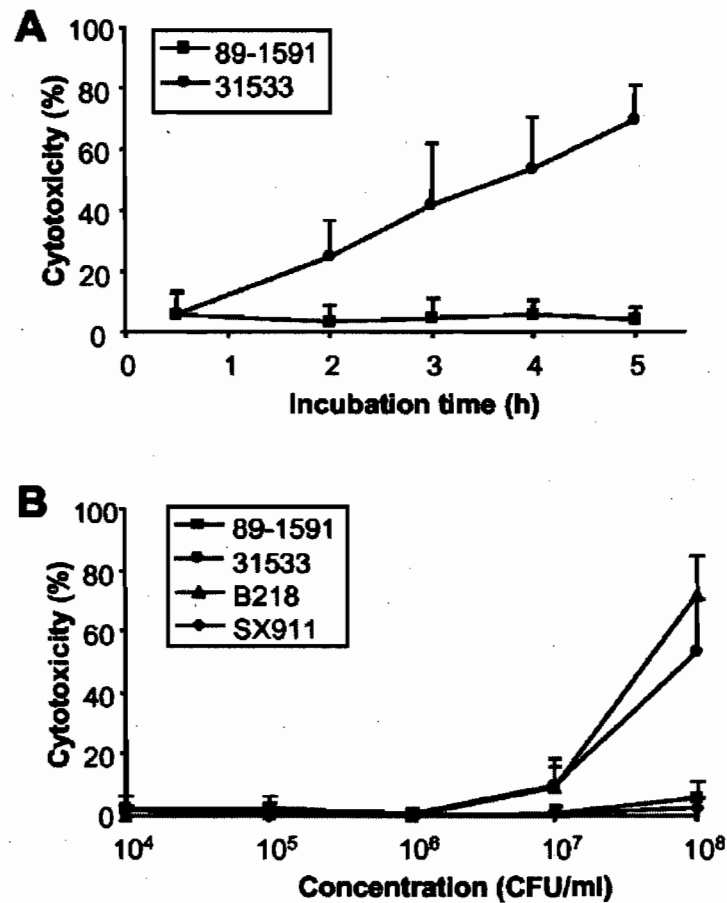


Figure 1. (A) Kinetics of cytotoxicity of *S. suis* (10⁸ CFU/ml) for PBMEC. (B) Effect of *S. suis* concentration on PBMEC injury. The cytotoxic effect of bacteria was evaluated by measuring LDH release in the presence of different concentrations of an *S. suis* strain after 4 h of incubation. The data are the percentages of cytotoxicity in infected wells compared with the cytotoxicity in control wells with PBMEC alone. The error bars indicate standard deviations. See Table 1 for a description of the strains.

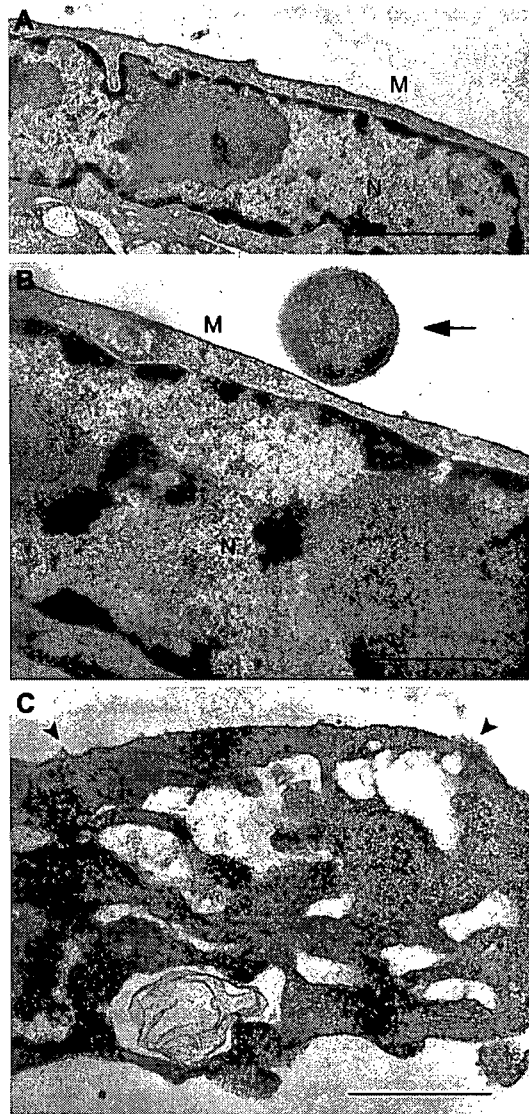


Figure 2. TEM micrographs showing the PBMEC injury caused by *S. suis* at a concentration of 10^8 CFU/ml. (A) Noninfected control cells. Bar = 2 μ m. (B and C) Cells incubated for 2 h with suilysin-negative strain 89-1591 (B) or suilysin-positive strain 31533 (C). Bars = 1 μ m. The PBMEC integrity after 2 h of incubation with strain 89-1591 was comparable to that of noninfected control cells. Injury was manifested by a loss of cell membrane integrity and disappearance of the nucleus. The arrow indicates an *S. suis* 89-1591 coccus. The arrowheads indicate disruption of the cell membrane. M, cell membrane; N, nucleus.

***S. suis* adheres to PBMEC.** The kinetics of adhesion to PBMEC were compared for different strains of *S. suis*. As shown in Fig. 3A to D, adhesion to PBMEC was time dependent. The kinetics of adhesion were similar for strains 31533 and 89-1591 ($P > 0.05$), and they reached a plateau after between 4 and 6 h of incubation. Experiments were performed to optimize and standardize the

adhesion assay for *S. suis* by using the lowest bacterial concentration that allowed recovery of significant numbers of colonies on THB agar. These conditions were optimal for an inoculum of 10^6 CFU of PBMEC per well (a multiplicity of infection of approximately 4:1). Unencapsulated mutant B218 exhibited earlier adhesion and a higher level of adhesion to PBMEC ($P < 0.01$) than its parental strain 31533 (Fig. 3A and B). Suilysin-negative mutant SX911 adhered to PBMEC in a way similar ($P > 0.05$) to the way that parental strain 31533 adhered during this period (Fig. 3A and C), reaching a plateau after between 4 and 6 h of incubation. Adhesion of *S. suis* to PBMEC was confirmed by TEM (Fig. 2B) and SEM (Fig. 4A).

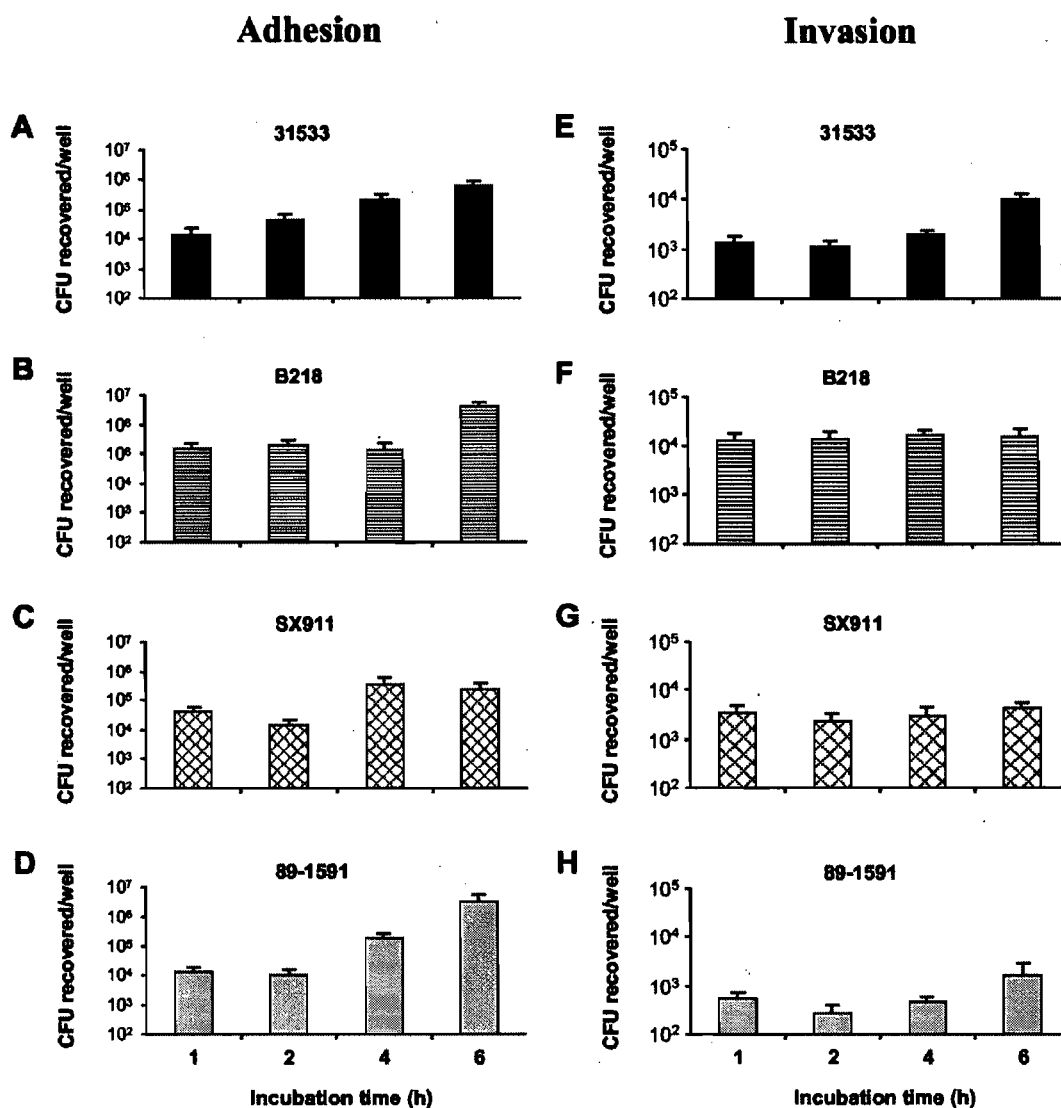


Figure 3. (A to D) Kinetics of *S. suis* adhesion to PBMEC. Results were determined after exposure of PBMEC to *S. suis* (10^6 CFU/ml), followed by extensive washing of nonadherent bacteria and cell lysis to obtain *S. suis* viable plate counts on THB agar. (E to H) Kinetics of PBMEC invasion by *S. suis* (10^6 CFU/ml). Results were determined as described above except that after washing, the bacteria and cells were exposed to antibiotics to kill extracellular bacteria. See Table 1 for a description of the strains.

***S. suis* invades PBMEC.** The kinetics of invasion of PBMEC were examined for different strains of *S. suis* at a concentration of 10^6 CFU/ml (Fig. 3E to H). The levels of invasion of PBMEC by *S. suis* strains did not increase significantly during the period of time studied, except for strain 31533 between 4 and 6 h ($P < 0.01$). The increase in the level of invasion was not due to an increase

in extracellular bacterial growth (data not shown). The levels of invasion for strain 31533 were higher ($P < 0.05$) than those observed with strain 89-1591. Similar to the results for adhesion, unencapsulated mutant B218 exhibited earlier invasion and a higher level of invasion of PBMEC ($P < 0.05$) than parental strain 31533, and saturated levels of invasion were observed during the experiment (Fig. 3E and F). Invasion of PBMEC by sullysin-negative mutant SX911 was similar to that by parental strain 31533 ($P > 0.05$) (Fig. 3E and G). No cytotoxicity was detected when cells were incubated for more than 4 h with the bacterial concentration used for the adhesion and invasion studies. Invasion of PBMEC by *S. suis* was confirmed by SEM (Fig. 4) and TEM (Fig. 5). Figure 4 shows sequential interactions between *S. suis* and PBMEC. First, after 5 min of incubation, cocci were found to adhere to PBMEC (Fig. 4A). Next, after 2 h of incubation, they were observed in close contact with cells (Fig. 4B) and underneath the cell surface, behind the PBMEC membrane (Fig. 4C). Figure 5 confirms that there was intracellular invasion of PBMEC by *S. suis*. First, *S. suis* cells were observed in close contact with the PBMEC and within an invagination (Fig. 5A). Finally, Fig. 5B shows an intracellular *S. suis* coccus in a membrane-bound vacuole within a PBMEC. Time courses of PBMEC invasion were also determined for GBS strain COH1 at a concentration of 10^6 CFU/ml (data not shown). The invasion resulted in a peak of internalization after 4 h of incubation ($1.7 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$ CFU recovered/well). The level of invasion observed for GBS was higher than the levels of invasion observed with *S. suis* strains ($P < 0.01$). *S. gordonnii* strain Challis at concentrations up to 10^8 CFU/ml was used as a negative control for invasion assays, and no bacteria were recovered during the 6-h invasion period (data not shown).

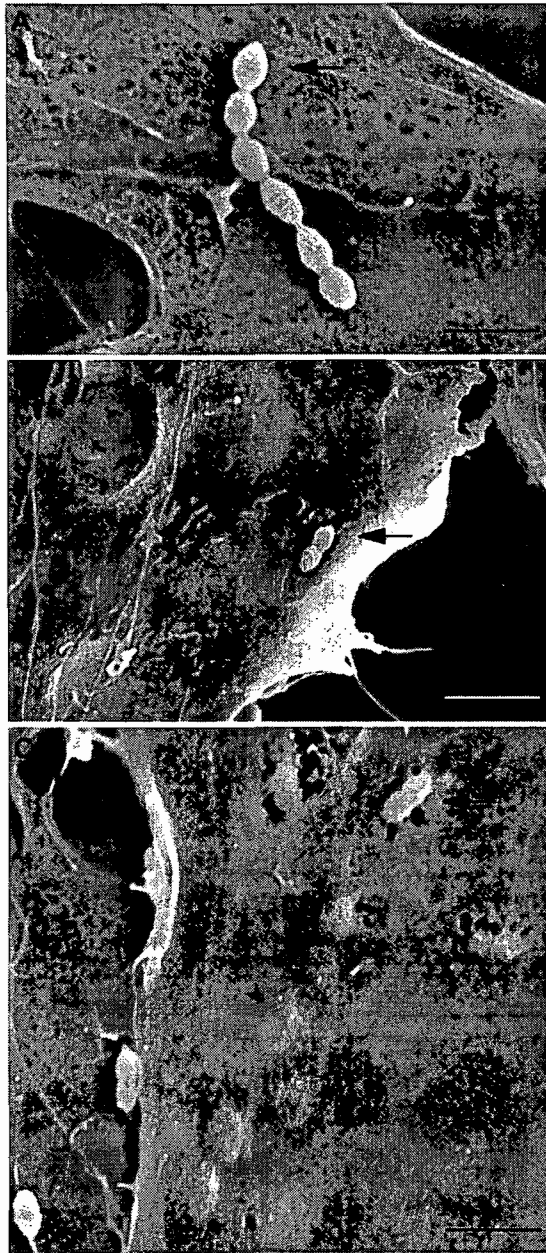


Figure 4. SEM micrographs showing *S. suis* (10^6 CFU/ml) interactions with PBMEC after 5 min (A) and 2 h (B and C) of incubation. First, cocci were shown to adhere to PBMEC (A). Next, they were observed in close contact with cells (B). Finally, streptococci were found within invagination structures, as well as underneath the cell surface, behind the PBMEC membrane (C). (A and C) Bars = 1 μ m. (B) Bar = 1.5 μ m. The arrows indicate *S. suis* cocci. The arrowheads indicate *S. suis* cocci behind the cell membrane.

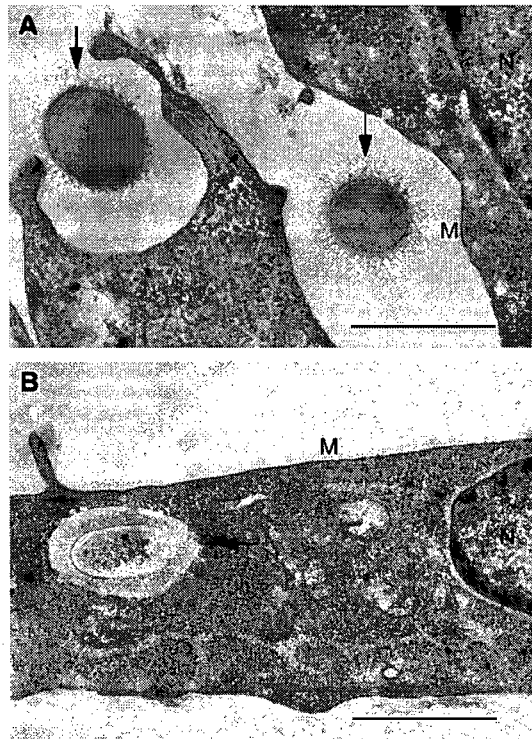


Figure 5. TEM micrographs showing invasion of PBMEC by *S. suis* at a concentration of 10^6 CFU/ml after 4 h of incubation. *S. suis* cells were observed in close contact with PBMEC and within invaginations (A). An intracellular *S. suis* coccus is present in a membrane-bound vacuole in a PBMEC in panel B. (A) Bar = 1 μ m. (B) Bar = 1.25 μ m. The arrows indicate *S. suis* cocci. M, cell membrane; N, nucleus.

***S. suis* intracellular survival in PBMEC.** As shown in Fig. 6, after an initial 2-h invasion period and a minimal 1-h antibiotic treatment, viable *S. suis* strains 31533 and 89-1591 could be found inside PBMEC up to 7 h of additional incubation, which was performed in the presence of antibiotics to avoid any extracellular source of bacteria. The results showed that there were similar ($P > 0.05$) gradual decreases in the number of viable intracellular bacteria for the two strains. In experiments in which reduced concentrations of gentamicin and penicillin G were used during the survival assay, no significant differences in the numbers of viable intracellular bacteria compared to the numbers obtained with the usual antibiotic doses were observed ($P > 0.05$) (data not shown). In contrast to the decreasing levels of *S. suis*, the intracellular GBS levels remained constant throughout this period ($2.7 \times 10^4 \pm 0.9 \times 10^4$ CFU recovered/well), confirming that the decreasing levels of viable intracellular *S. suis* cells were not related to antibiotic uptake.

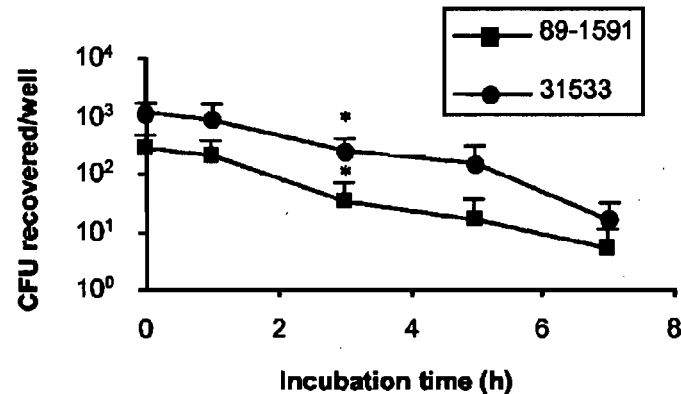


Figure 6. Intracellular survival of *S. suis* in PBMEC. After 2 h of invasion by *S. suis* (10^6 CFU/ml), the initial gentamicin-penicillin G treatment was lengthened for different times up to 7 h, and cells were lysed to quantify intracellular bacteria by viable plate counting on THB agar. An asterisk indicates the incubation time from which the number of intracellular bacteria recovered per well is significantly different ($P < 0.05$) from number of intracellular bacteria obtained after an initial 1-h antibiotic treatment.

Effect of bacterial RNA and protein synthesis inhibitors on PBMEC invasion by *S. suis*. To evaluate the possible role of bacterial RNA and protein synthesis in *S. suis* invasion of PBMEC, bacteria were pretreated with rifampin or tetracycline. When used at its MIC, neither rifampin nor tetracycline inhibited PBMEC invasion by *S. suis* strain 31533 ($90\% \pm 37\%$ and $100\% \pm 40\%$ invasion, respectively ($P > 0.05$)). Similar levels of invasion were observed with concentrations corresponding to one-half and two times the MICs of the two antibiotics (data not shown).

Effects of microfilament and microtubule formation inhibitors on PBMEC invasion by *S. suis*. To evaluate the possible roles of microfilaments and microtubules in *S. suis* invasion of PBMEC, cells were pretreated with cytochalasin D and colchicine, respectively. As shown in Fig. 7, cytochalasin D inhibited the invasion of PBMEC by *S. suis* strain 31533 in a concentration-dependent manner. At a concentration of $0.5 \mu\text{g/ml}$, more than 60% inhibition of invasion was observed ($P < 0.05$). The highest level of inhibition (more than 80%) was observed at a concentration of $1.0 \mu\text{g/ml}$ or higher. On the other hand, colchicine did not inhibit the invasion of PBMEC by *S. suis* strain 31533 ($P > 0.05$) despite the use of inhibitor concentrations up to $20 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 7). None of the products used as

inhibitors of PBMEC invasion was found to be toxic for cells at the concentrations used (data not shown).

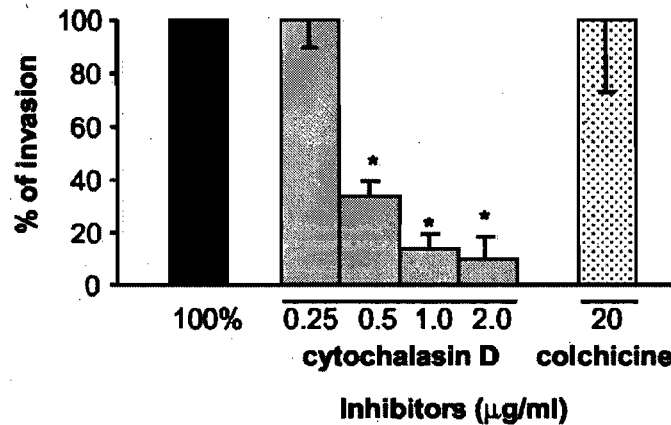


Figure 7. Inhibition of invasion of PBMEC by *S. suis* strain 31533 with cytochalasin D and colchicine. PBMEC monolayers were preincubated with the appropriate concentrations of inhibitors at 37°C for 30 min prior to infection, as well as during the 2-h invasion period. An asterisk indicates that the *P* value is <0.05 for a comparison with the level of invasion without inhibitor (considered 100% invasion).

DISCUSSION

The pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* is poorly understood. The presence of high levels of bacteria in the bloodstream of diseased animals is correlated with the presence of clinical signs and symptoms in such animals (6). In order to gain access to the CNS and cause the disease, circulating *S. suis* has to cross the BBB. In fact, *S. suis* is frequently isolated from brains of diseased pigs with clinical meningitis (22, 31). Interactions between BMEC and *S. suis* have not been completely characterized, and no data are available on such interactions with cells of porcine origin. Indeed, this study shows for the first time that *S. suis* is able to interact with PBMEC, and this interaction may play an important role in the development of meningitis.

Adhesion of *S. suis* to PBMEC is time dependent, as previously reported by Charland et al. for HBMEC (10). Despite the fact that the presence of the capsule does not seem to prevent bacterium-cell contact, a significantly higher rate of adherence was observed in the absence of CPS, as observed with unencapsulated

S. suis mutant B218. Similar observations were reported previously for *S. suis* with epithelial cells of swine origin (29). An adhesin(s) responsible for cell adhesion might be present in the cell wall and, although exposed at the bacterial cell surface, might be partially covered by the CPS. Thus, preliminary studies showed that purified *S. suis* cell wall partially inhibits attachment of whole bacteria to PBMEC (unpublished observations). Cell wall components of other wellencapsulated bacterial pathogens, such as *S. pneumoniae* and group A and B streptococci, have been described as being responsible for adhesion to host cells (1, 5, 32). Interestingly, a previous study showed that an *S. suis* strain and its unencapsulated mutant adhered similarly to human endothelial cells (10). As discussed below, adhesins and cell receptors involved in the interaction between *S. suis* and endothelial cells of human and swine origin may be different.

This study demonstrated that *S. suis* does invade PBMEC. To the best of our knowledge, this is the first report of *S. suis* invasion of endothelial cells of porcine brain origin. Invasion of BMEC by free bacteria has also been reported for other meningeal pathogens, like GBS (34), *E. coli* K1 (3), *S. pneumoniae* (38), *Citrobacter freundii* (4), and *Listeria monocytogenes* (54). In contrast, previous studies showed that although *S. suis* was able to adhere to and activate HBMEC, it was not able to invade this type of cells (10, 51). Interestingly, these studies were carried out with strains 31533 and 89-1591, which were also used in the present work. The fact that *S. suis* invades PBMEC and not HBMEC could be related to the cell origin, since the natural host for *S. suis* is the pig. On the other hand, the lack of invasion of the HBMEC cell line could be related to the lack of an *S. suis*-specific receptor(s) for invasion at the cell surface. While adhesion without invasion was reported by Lalonde et al. (29) for epithelial cells of porcine origin and human origin, Norton et al. demonstrated by using differential fluorescence that some *S. suis* strains were able to adhere to and invade (as a rare event) human Hep-2 epithelial cells (35). Thus, the specific and clear invasion of PBMEC by *S. suis* reported here may have a significant impact on our understanding of the pathogenesis of *S. suis* meningitis. Adhesion to and invasion of PBMEC by *S. suis* were confirmed by SEM and TEM. First, cocci were shown to adhere to PBMEC by SEM and TEM. Later, *S. suis* bacteria were found within invagination structures, as well as behind the

PBMEC membrane (by SEM) and inside a membrane-bound vacuole within a PBMEC (by TEM).

The presence of a capsule seems to partially interfere with invasion since unencapsulated *S. suis* mutant B218 invaded PBMEC to a greater extent than the parental encapsulated strain. Similar interference of the capsule with invasion has been reported for HUVEC invasion by *Haemophilus influenzae* (53) and for BMEC invasion by *S. pneumoniae* (38). It should be noted that the higher level of invasion by the unencapsulated *S. suis* mutant may be due to the higher level of adherence of this mutant to PBMEC. As mentioned above, it is possible that the polysaccharide capsule causes steric interference with certain bacterial cell wall receptor-ligand interactions which may be important in the invasion process. Interestingly, as observed in adhesion studies, preliminary data showed that purified *S. suis* cell wall partially inhibits PBMEC invasion by *S. suis* (unpublished observations). The fact that the *S. suis* CPS is essential for resisting phagocytosis but not for the BBB invasion process is in agreement with data obtained with *E. coli* K1 (24). On the other hand, it has been reported recently that the hemolysin produced by GBS contributes significantly to cell invasion (14). This is not the case for *S. suis*, as the results obtained in this study showed that the suilysin-negative mutant has in vitro invasion properties similar to those of its parental strain.

Our results showed that *S. suis* is able to survive, to a certain extent, inside PBMEC. However, it should be noted that the number of intracellular viable *S. suis* cells gradually decreased. In contrast to the levels of *S. suis*, the levels of viable GBS remained constant during the same period in PBMEC. These results are in agreement with the constant levels of viable intracellular GBS in BMEC reported by Nizet et al. (34). The ability to cross an in vitro transwell model of BBB has been reported for *S. pneumoniae* in BMEC, although a clear in vitro decrease in the number of internalized viable cocci was reported for this pathogen (38). In fact, it has been suggested that many invading pathogens enter endothelial cells in a transient process (23).

In order to preliminarily characterize *S. suis* invasion of PBMEC, bacteria were pretreated with bacterial RNA and protein synthesis inhibitors. Results

obtained in this study suggest that active bacterial RNA and protein synthesis may not be essential for penetration of the PBMEC. This is in agreement with results reported by Virji et al. for invasion of HUVEC by *H. influenzae* (53). However, Nizet et al. (34) reported that invasion of BMEC by GBS was dependent on such synthesis. Thus, the requirement for novel RNA and protein synthesis for invasion of host cells is not a generalized mechanism in bacterial species. In this case, the interaction of a putative surface adhesin that is already present with a cell receptor would be sufficient to trigger bacterial internalization (25, 49). This was further demonstrated by Sinha et al. (44), who showed that *Staphylococcus aureus* cell invasion occurred even with formaldehyde-treated bacteria. To evaluate the possible role of microfilaments and microtubules in *S. suis* invasion of PBMEC, eukaryotic cells were pretreated with the appropriate inhibitors. Cytochalasin D, but not colchicine, inhibited invasion, suggesting that actin microfilaments of the host cytoskeleton, but not microtubular cytoskeletal elements, are required for internalization of *S. suis*. This is in agreement with the actin-dependent and microtubule-independent mechanism of HUVEC invasion by *S. pyogenes* and GBS reported by Greco et al. (20).

In addition to adhesion and invasion, under certain conditions and with certain strains, bacterial cytotoxicity was observed. According to results obtained in this study, suilysin seems to be the *S. suis* factor responsible for the in vitro PBMEC cytotoxicity. Indeed, only suilysin-positive strains were cytotoxic for PBMEC. Moreover, the suilysin-negative mutant SX911 was shown to be noncytotoxic even at a high concentration. In previous studies workers have reported toxicity of suilysin for human endothelial cells (10), swine epithelial cells (29, 35), and murine and human phagocytic cells (42,43). Use of purified suilysin confirmed the toxic potential of this cholesterol-binding toxin. Interestingly, an unencapsulated mutant did not have a higher cytotoxic capacity than the encapsulated parent strain, indicating that the well-exposed cell wall does not seem to be toxic to PBMEC. Similarly, although the pneumococcal cell wall was shown to be toxic for HUVEC (16), it has been recently demonstrated that the pneumolysin (another member of the cholesterol-binding toxin family) is the only factor of *S. pneumoniae* that is responsible for the toxicity for bovine BMEC (55).

Like the effects of other toxins, the combined toxic effect with inflammatory potential (7, 12, 14, 37, 39) recently reported for the suilysin (30, 51) may play an important role not only in BBB permeability but also by increasing leukocyte influx. Indeed, histopathological findings indicating that there is necrosis of vessel walls in association with inflammatory cellular aggregates have been reported for *S. suis*-affected pigs (40).

In conclusion, in this paper we describe for the first time the interactions between *S. suis* and PBMEC. In contrast to what was reported previously for HBMEC, *S. suis* is able to invade BMEC of swine origin. Further studies are needed to characterize the molecule(s) responsible for adherence to and/or invasion of PBMEC. In swine, invasion of endothelial cells forming the BBB could play an important role in the pathogenesis of meningitis caused by *S. suis*. The capacity to invade combined with the suilysin-related cytotoxicity (for suilysinpositive strains) may have a direct impact on the pathological potential of an *S. suis* strain.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Montpetit from the Centre de Recherche et Développement sur les Aliments (CRDA) for the TEM and SEM. We are also indebted to P. Willson for providing a mutant strain used in this study. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 0680154280 and by Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR-équipe) grant 99-ER-0214. G.V. is a recipient of an NSERC scholarship.

REFERENCES

1. **Andersson, B., E. H. Beachey, A. Tomasz, E. Tuomanen, and C. Svanborg-Eden.** 1988. A sandwich adhesion on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Microb. Pathog.* **4**:267–278.
2. **Arends, J. P., and H. C. Zanen.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. Infect. Dis.* **10**:131–137.
3. **Badger, J. L., and K. S. Kim.** 1998. Environmental growth conditions influence the ability of *Escherichia coli* K1 to invade brain microvascular endothelial cells and confer serum resistance. *Infect. Immun.* **66**:5692–5697.
4. **Badger, J. L., M. F. Stins, and K. S. Kim.** 1999. *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **67**:4208–4215.
5. **Beachey, E. H.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J. Infect. Dis.* **143**:325–345.
6. **Berthelot-Herault, F., R. Cariolet, A. Labbe, M. Gottschalk, J. Y. Cardinal, and M. Kobisch.** 2001. Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* **65**:196–200.
7. **Braun, J. S., R. Novak, G. Gao, P. J. Murray, and J. L. Shenep.** 1999. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect. Immun.* **67**:3750–3756.
8. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325–332.
9. **Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doize, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **14**:195–203.
10. **Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **68**:637–643.
11. **Chatellier, S., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau, and J. Harel.** 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* **37**:362–366.
12. **Cockeran, R., R. Anderson, and C. Feldman.** 2002. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**:235–239.
13. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* **70**:1319–1325.
14. **Doran, K. S., J. C. Chang, V. M. Benoit, L. Eckmann, and V. Nizet.** 2002. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J. Infect. Dis.* **185**:196–203.

15. **Elliott, S. D., and J. Y. Tai.** 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. J. Exp. Med. **148**:1699–1704.
16. **Geelen, S., C. Bhattacharyya, and E. Tuomanen.** 1993. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. Infect. Immun. **61**:1538–1543.
17. **Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith, and U. Vecht.** 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. Can. J. Vet. Res. **62**:75–79.
18. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet. Microbiol. **76**: 259–272.
19. **Gottschalk, M. G., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. Microbiology **141**:189–195.
20. **Greco, R., L. De Martino, G. Donnarumma, M. P. Conte, L. Seganti, and P. Valenti.** 1995. Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. Res. Microbiol. **146**:551–560.
21. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1999. Streptococcal diseases, p. 563–570. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine. Iowa State University, Ames.
22. **Higgins, R., M. Gottschalk, K. R. Mittal, and M. Beaudoin.** 1990. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. Can. J. Vet. Res. **54**:170–173.
23. **Hippenstiel, S., and N. Suttorp.** 2003. Interaction of pathogens with the endothelium. Thromb. Haemostasis **89**:18–24.
24. **Hoffman, J. A., C. Wass, M. F. Stins, and K. S. Kim.** 1999. The capsule supports survival but not traversal of *Escherichia coli* K1 across the blood-brain barrier. Infect. Immun. **67**:3566–3570.
25. **Huang, S. H., and A. Y. Jong.** 2001. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. Cell. Microbiol. **3**:277–287.
26. **Huang, S. H., M. F. Stins, and K. S. Kim.** 2000. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. Microbes Infect. **2**:1237–1244.
27. **Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg, and P. K. Storm.** 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. **62**:1742–1748.
28. **Kobisch, M., M. Gottschalk, P. Morvan, R. Cariolet, G. Bénévent, and J. P. Joly.** 1995. Experimental infection of SPF piglets with *Streptococcus suis* serotype 2. J. Rech. Porcine Fr. **27**:97–102.
29. **Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. Microbiology **146**:1913–1921.
30. **Lun, S., J. Perez-Casal, W. Connor, and P. J. Willson.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. Microb. Pathog. **34**:27–37.
31. **Madsen, L. W., B. Svensmark, K. Elvestad, B. Aalbaek, and H. E. Jensen.** 2002. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. J. Comp. Pathol. **126**:57–65.

32. **Nealon, T. J., and S. J. Mattingly.** 1985. Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect. Immun.* **50**:107–115.
33. **Nizet, V., R. L. Gibson, E. Y. Chi, P. E. Framson, M. Hulse, and C. E. Rubens.** 1996. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**:3818–3826.
34. **Nizet, V., K. S. Kim, M. Stins, M. Jonas, E. Y. Chi, D. Nguyen, and C. E. Rubens.** 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect. Immun.* **65**:5074–5081.
35. **Norton, P. M., C. Rolph, P. N. Ward, R. W. Bentley, and J. A. Leigh.** 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**:25–35.
36. **Prasadaraao, N. V., C. A. Wass, and K. S. Kim.** 1996. Endothelial cell GlcNAc beta 1–4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **64**:154–160.
37. **Ring, A., and E. Tuomanen.** 2000. Host cell invasion by *Streptococcus pneumoniae*. *Subcell. Biochem.* **33**:125–135.
38. **Ring, A., J. N. Weiser, and E. I. Tuomanen.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Investig.* **102**:347–360.
39. **Rose, F., S. A. Zeller, T. Chakraborty, E. Domann, T. Machleidt, M. Kronke, F. Grimminger, and U. Sibelius.** 2001. Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Infect. Immun.* **69**:897–905.
40. **Sanford, S.** 1987. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. *Can. J. Vet. Res.* **51**:486–489.
41. **Segers, R. P., T. Kenter, L. A. de Haan, and A. A. Jacobs.** 1998. Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:255–261.
42. **Segura, M., and M. Gottschalk.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect. Immun.* **70**:4312–4322.
43. **Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect. Immun.* **67**:4646–4654.
44. **Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann, and K. H. Krause.** 1999. Fibronectin binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell. Microbiol.* **1**:101–117.
45. **Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* **67**:1750–1756.

46. **Smith, H. E., F. H. Reek, U. Vecht, A. L. Gielkens, and M. A. Smits.** 1993. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infect. Immun.* **61**:3318–3326.
47. **Smith, H. E., U. Vecht, A. L. Gielkens, and M. A. Smits.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein (muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* **60**:2361–2367.
48. **Teifel, M., and P. Friedl.** 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1–2 from porcine brains. *Exp. Cell Res.* **228**:50–57.
49. **Townsend, G. C., and W. M. Scheld.** 1995. Microbe-endothelium interactions in blood-brain barrier permeability during bacterial meningitis. *ASM News* **61**:294–298.
50. **Tuomanen, E.** 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:289–299.
51. **Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier, and M. Gottschalk.** 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**:49–58.
52. **Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* **59**:3156–3162.
53. **Virji, M., H. Kayhty, D. J. Ferguson, C. Alexandrescu, and E. R. Moxon.** 1991. Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb. Pathog.* **10**:231–245.
54. **Wilson, S. L., and D. A. Drevets.** 1998. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **178**:1658–1666.
55. **Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck, and H. P. Heinz.** 2001. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**:845–852.

ARTICLE II**Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2**

Ghyslaine Vanier¹, Mariela Segura², Marcelo Gottschalk¹

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 2M2¹; Centre for the Study of Host Resistance, McGill University Health Centre Research Institute, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Québec H3G 1A4².

Canadian Journal of Veterinary Research. 2007. 71 (2): 81-89.

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé activement à la conception et au désign expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine pathogen associated mainly with meningitis. In a previous study, we demonstrated the ability of *S. suis* serotype 2 to adhere to and invade immortalized porcine brain microvascular endothelial cells (PBMECs) forming the blood–brain barrier. The aim of the current work was to further characterize the mechanism(s) by which *S. suis* invades porcine endothelial cells. The ability of several *S. suis* strains to interact with PBMECs was not found to correlate with their geographic origin, virulence, host of origin, or suilysin production. Characterization studies demonstrated that proteinaceous adhesins/invasins, cell wall components, lipoteichoic acid, and serum components (including fibronectin) were involved in interactions between *S. suis* and PBMECs. In addition to PBMECs, *S. suis* was able to adhere to and invade 2 porcine aortic endothelial cell lines and primary PBMECs.

RÉSUMÉ

Streptococcus suis de sérotype 2 est un pathogène important du porc souvent associé à la méningite. Dans une étude précédente, nous avons démontré la capacité de *S. suis* de sérotype 2 à adhérer aux et à envahir des cellules endothéliales porcines de microvaisseaux cérébraux immortalisées (PBMEC) formant la barrière hémato-méningée. Le but de cette étude était de caractériser plus en détails les mécanismes par lesquels *S. suis* pour envahir les cellules endothéliales porcines. La capacité de plusieurs souches de *S. suis* à interagir avec les PBMEC ne corrélait pas avec leur origine géographique, leur virulence, l'hôte d'origine ni avec leur capacité de produire la suilysine. Des études de caractérisation ont démontré que des adhésines/invasines de nature protéique, des composantes de la paroi cellulaire, l'acide lipoteichoïque et des composantes du sérum (incluant la fibronectine) étaient impliqués dans les interactions de *S. suis* avec les PBMEC. En plus des PBMEC, *S. suis* était capable d'adhérer à et d'envahir deux différentes lignées cellulaires endothéliales d'aorte de porc ainsi que des PBMEC primaires.

(Traduit par les auteurs)

INTRODUCTION

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine bacterial pathogen associated mainly with meningitis but also with other infections, such as endocarditis, arthritis, septicemia, and pneumonia (17). Until recently, 35 serotypes were commonly accepted, but a study by Hill and colleagues (18) demonstrated that serotypes 32 and 34 should be clustered with *Streptococcus orisratti*. Serotype 2 is the most frequent serotype recovered from diseased animals (17). As a zoonotic agent, *S. suis* has been isolated from human cases of meningitis, endocarditis, and recurrent toxic shock (17). Although human cases are rare, in July 2005 an outbreak of *S. suis* that affected more than 200 people, mostly Chinese farmers who had slaughtered diseased pigs, was reported; the mortality rate was more than 20% (41).

Several virulence factors, such as hemolysin (suilysin) (16), a fibronectin- and fibrinogen-binding protein (FBPS) (10), adhesins (3), proteases (19), and other proteins (35, 37), have been proposed. The only factor identified thus far as playing a critical role in pathogenesis is capsular polysaccharide (CPS), a finding based on evidence that nonencapsulated isogenic mutants are nonpathogenic and are rapidly cleared from the bloodstream in both pig and mouse models of infection (5, 28). However, natural nonvirulent strains are encapsulated, which indicates that other virulence factors are also involved. Interestingly, European and North American strains of *S. suis* serotype 2 differ in their expression of virulence-associated markers and the production of suilysin (17). In addition, it has been suggested that European strains are more virulent than North American strains (15).

The pathogenesis of *S. suis* infection is still unclear. Once in the bloodstream, bacteria are able to reach the central nervous system (CNS). Indeed, *S. suis* is frequently isolated from the brain of diseased pigs with clinical signs of meningitis (17). One way by which bacteria could gain access to the CNS is by crossing the blood-brain barrier, which separates the CNS from the bloodstream and is formed in part by the endothelium lining the brain capillaries. This

endothelium is composed of brain microvascular endothelial cells (BMECs), is characterized by tight intercellular junctions and the presence of pericytes within the capillary basement membrane, and is surrounded by a sheath formed by astrocyte foot processes (15, 33).

In a recent study, we demonstrated the ability of *S. suis* serotype 2 to adhere to and invade immortalized porcine brain microvascular endothelial cells (PBMECs) (36). Interestingly, in most cases of bacterial meningitis, the BMECs seem to be the primary site of breakdown of the blood–brain barrier (33). Thus, the invasion of porcine endothelial cells forming the blood–brain barrier by *S. suis* is likely an important step in the pathogenesis of meningitis caused by *S. suis*. To better understand the interactions between *S. suis* and PBMECs, we aimed to further characterize the mechanisms used by *S. suis* to invade porcine endothelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. In this study, *S. suis* serotype 2 sullysin-positive virulent strain 31533 (36) served as the reference strain. In selected experiments, *S. suis* serotype 2 sullysin-negative virulent strain 89-1591 (2), used in a previous study with PBMECs, was also included (36). In addition, several *S. suis* isolates were used in comparative studies. The present study also involved an isogenic mutant derived from strain 31533: the nonencapsulated mutant B218, which was produced in our laboratory by allelic exchange and corresponded to a previously reported transposon-derived mutant 2A (5). Mutant B218 was shown to possess the same characteristics as mutant 2A, with a complete absence of capsular material at the bacterial surface. We also evaluated an isogenic knockout FBPS mutant and its wild-type *S. suis* strain, both kindly provided by Dr. Astrid de Greeff, Institute for Animal Science and Health, Lelystad, the Netherlands (10).

The bacteria were grown as previously described (36), were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and were appropriately diluted in cell culture medium before inoculation. An accurate determination of the number of

colony-forming units (CFUs) per milliliter in the final suspension was made by plating onto Todd Hewitt Broth (THB) agar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

Cell culture. The porcine brain microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 (30) was cultured as previously described (36). Briefly, cells were grown in complete IF medium, which is a mixture of 1:1 Iscove's modified Dulbecco's medium and Ham's F-12 (Invitrogen, Burlington, Ontario) supplemented with 7.5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin–streptomycin (Invitrogen), sodium bicarbonate, L-glutamine, human transferrin (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA), *N*-acetylcysteine, hypoxanthine, porcine heparin, human recombinant fibroblast growth factor-basic (Sigma, Oakville, Ontario), and β -mercaptoethanol (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). The porcine aortic endothelial cell line PAEC₁₁, kindly provided by Dr. Bernard Weill, Université Paris V, Paris, France (21), and the PAEC line AOC, kindly provided by Dr. José Yélamos, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain (4), were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) FBS, penicillin–streptomycin, and L-glutamine (MP Biomedicals). Flasks (Falcon; Becton Dickinson, Mississauga, Ontario) and 24-well tissue culture plates (Primaria; Falcon) were precoated with 1% (w/v) type A gelatin from porcine skin (Sigma) to support the cells. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humid atmosphere and used before the 20th passage in all experiments. For assays, we trypsinized PBMEC, PAEC₁₁, and AOC cells by adding a trypsin–ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) solution (Invitrogen) and then diluted the mixture in the culture medium at 8×10^4 , 1.5×10^5 , and 1.2×10^5 cells/mL, respectively. The cell suspension was distributed in tissue culture plates and incubated to confluence. Primary PBMECs (pPBMECs) were purchased from Cell Systems Corporation (Kirkland, Washington, USA) and grown according to the supplier's recommendations. For pPBMEC assays, the cell suspension was distributed in tissue culture plates at a concentration of 1×10^5 cells/mL and incubated to confluence. Immediately before the experiments, medium was removed from the plates and replaced by the respective medium without antibiotics.

Cell adhesion and invasion assays. The adhesion assay to quantify total cell-associated (intracellular plus surface-adhered) bacteria was performed as previously described (36), with some modifications. Briefly, bacteria were pelleted, washed twice with PBS, and resuspended at 10^6 CFU/mL in fresh cell culture medium without antibiotics. Confluent cell monolayers were inoculated with 1-mL aliquots of bacterial suspension. The plates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min to bring bacteria to the surface of the monolayer and incubated for 2 h at 37°C with 5% CO_2 . The monolayers were then vigorously washed 5 times to eliminate nonspecific bacterial attachment. The presence of *S. suis* was verified in the last wash: no significant numbers of *S. suis* were found (data not shown). The plates were then incubated for 10 min at 37°C in the presence of 200 μL of 0.05% trypsin–0.03% EDTA. Next, 800 μL of ice-cold deionized water was added, and cells were disrupted by scraping the bottom of the well and by repeated pipetting to liberate cell-associated bacteria. Serial dilutions of this cell lysate were plated onto THB agar and incubated overnight at 37°C , after which the bacteria were counted. To ensure that the use of gelatin in the well did not provoke an artificially high estimate of the number of adherent *S. suis*, an adhesion assay was performed directly into the gelatin-coated well (without endothelial cells): *S. suis* was shown not to adhere to this protein (data not shown). Levels of adhesion were expressed as the total number of CFUs recovered per well. Cytotoxicity controls were performed with the CytoTox 96 nonradioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA): no cytotoxicity was detected under the assay conditions (data not shown).

The invasion assay to quantify intracellular bacteria was performed in a similar manner. However, to kill extracellular and surface-adhered bacteria after the initial infection period, cells were washed twice with PBS, and 1 mL of cell culture medium containing 100 $\mu\text{g/mL}$ of gentamicin and 5 $\mu\text{g/mL}$ of penicillin G (Sigma) was added to each well. After incubation for 1 h at 37°C with 5% CO_2 , monolayers were washed 3 times with PBS before incubation with 0.05% trypsin–0.03% EDTA. Levels of invasion were expressed as the total number of CFUs recovered per well. The efficiency of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria

was confirmed by plating a 100- μ L sample of the last PBS wash suspension onto THB agar (data not shown).

Studies to characterize PBMEC invasion by *S. suis*. To study the role of proteins in bacterial invasion, we treated *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/mL) with 0.1 to 2 mg/mL of proteinase K (Roche Diagnostics, Laval, Quebec), 50 to 500 μ g/mL of pronase (Roche), or 0.5 to 4 mg/mL of trypsin (Invitrogen) for 1 h at 37°C, then washed the bacteria twice in PBS and resuspended them in culture medium before PBMEC inoculation. To evaluate the role of bacterial cell surface components, we performed competitive studies by pretreating PBMECs at 37°C with 10 to 200 μ g/mL of purified *S. faecalis* lipoteichoic acid (LTA; Sigma) for 90 min, 100 μ g/mL of sialic acid (Sigma) for 60 min, or 1 to 100 μ g/mL of purified cell wall of *S. suis* serotype 2 for 30 min. Since LTA from *S. suis* is currently not available, but *S. suis* LTA and *S. faecalis* LTA both react with group D antiserum and have some structural similarities (11), we used LTA from *S. faecalis* as an appropriate alternative. Purified cell wall of *S. suis* was produced as previously described (26) and contained less than 7% (w/w) of protein, as detected with the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA). To verify the role of soluble fibronectin in bacterial invasion, *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/mL) was also preincubated with 250 μ g/mL of human plasma fibronectin (Roche Diagnostics) for 1 h at 37°C, washed in PBS, and resuspended in culture medium before PBMEC inoculation. A standard PBMEC invasion assay was also performed in the absence of serum, in the presence of 50% (v/v) FBS, or in the presence of 7.5% to 50% (v/v) heat-inactivated swine serum (free of anti-*S. suis* antibodies).

Statistical analysis. All data were expressed as mean (and standard deviation). Data were analyzed by a 2-tailed, unpaired *t* test. To compare the adhesion and invasion capacities of several *S. suis* strains, we used a linear mixed model. A *P*-value of less than 0.05 was considered significant. All assays were repeated at least 3 times.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of adhesion and invasion capacities of several *S. suis* strains Several *S. suis* serotype 2 strains (Table I) were compared for their ability to adhere to and invade PBMECs according to their host and geographic origins, production of suilysin, and virulence. Strains of human or swine origin showed similar levels of adhesion and invasion, in agreement with previous studies showing no differences among human and swine strains in the level of adhesion to human BMECs or human and swine epithelial cells (6, 20). Although it has been reported that serotype 2 strains of different geographic origins are phenotypically and genotypically different (17), there were no significant differences in mean adhesion and invasion levels between the European and North American strains that we evaluated (Figure 1). In addition, most European strains produce suilysin (17). As was reported from a previous study using a suilysin-negative mutant (36), we observed no correlation between suilysin production and level of adhesion or invasion in a comparative analysis of the different strains. Collectively, these data suggest that factors additional to the capacity for adhesion and invasion of PBMECs may account for the observation that serotype 2 strains from Europe are more virulent than North American strains (2, 15).

Although the number of nonvirulent strains that we evaluated was low, these strains showed mean levels of adhesion and invasion similar to those observed with virulent strains (Figure 1). However, as described for *Escherichia coli* K1 (40), a high-grade bacteremia was required for *S. suis* to reach the CNS, thus suggesting a critical role for bacterial survival and dissemination in blood in the process of *S. suis* invasion of the blood–brain barrier at high levels (1).

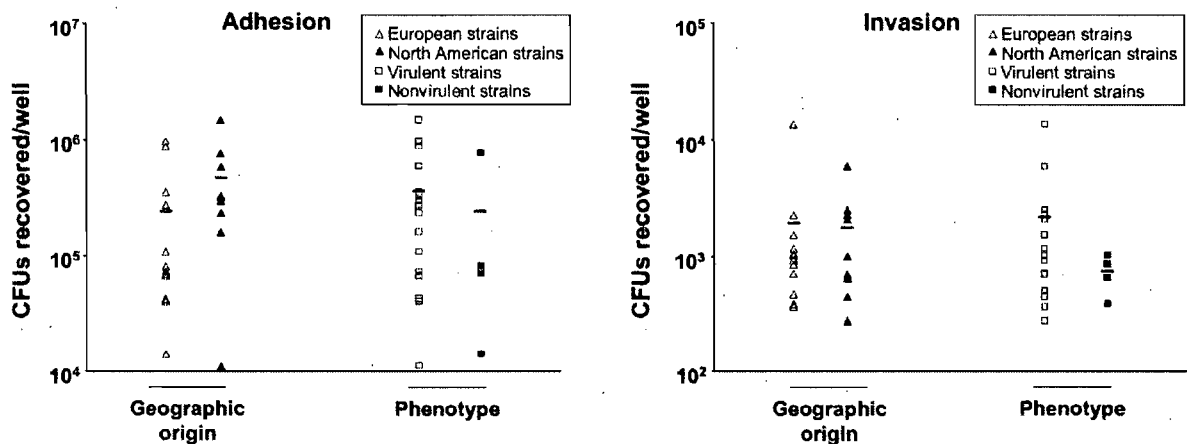


Figure 1. Interactions between porcine brain microvascular endothelial cells (PBMECs) and *Streptococcus suis* according to geographic origin and phenotype (virulent or not) of the *S. suis* strain. In assays, adhesion to or invasion of PBMECs by *S. suis* strains was expressed as the mean number (bar) of colony-forming units (CFUs) recovered per well for each group of strains 2 h after inoculation of 10^6 CFU/mL.

Table 1. Capacities of strains of *Streptococcus suis* to adhere to and invade porcine brain microvascular endothelial cells

Strain	Geographic origin	Virulence	Suilysin production	Host of origin	Colony-forming units recovered per well; mean (and standard deviation)	
					Adhesion assay	Invasion assay
LEF95	France	+	+	Human	$9.73 (1.42) \times 10^5$	$9.30 (4.27) \times 10^2$
H11/1	United Kingdom	+	+	Human	$2.76 (1.38) \times 10^5$	$4.83 (1.59) \times 10^2$
AR770353	The Netherlands	+	-	Human	$8.87 (1.46) \times 10^5$	$1.05 (0.30) \times 10^3$
166'	France	+	+	Swine	$7.38 (4.74) \times 10^4$	$7.18 (4.11) \times 10^2$
90-1330	Canada	-	-	Swine	$7.83 (1.32) \times 10^5$	$6.53 (2.32) \times 10^2$
94-623	France	-	-	Swine	$7.10 (1.71) \times 10^4$	$1.04 (0.15) \times 10^3$
SX332	United States	+	+	Swine	$3.37 (2.73) \times 10^5$	$2.31 (1.54) \times 10^3$
95-8242	Canada	+	+	Swine	$2.38 (1.40) \times 10^5$	$2.10 (1.39) \times 10^3$
98-B575	Canada	+	-	Swine	$1.63 (0.76) \times 10^5$	$1.02 (0.42) \times 10^3$
98-B099	Canada	+	-	Swine	$1.49 (0.64) \times 10^6$	$2.52 (1.10) \times 10^3$
98-8993	Canada	+	-	Swine	$3.30 (2.46) \times 10^5$	$6.03 (0.60) \times 10^3$
S735	The Netherlands	+	+	Swine	$4.10 (0.92) \times 10^4$	$3.70 (1.66) \times 10^2$
D282	The Netherlands	+	+	Swine	$6.82 (2.19) \times 10^4$	$2.28 (0.82) \times 10^3$
24	France	+	+	Swine	$3.58 (2.44) \times 10^5$	$1.37 (0.31) \times 10^4$
89-999	Canada	+	-	Swine	$6.03 (2.70) \times 10^5$	$4.47 (3.97) \times 10^2$
AAH4	United States	+	-	Swine	$3.07 (0.20) \times 10^5$	$7.00 (0.36) \times 10^2$
T15	The Netherlands	-	-	Swine	$1.41 (0.39) \times 10^4$	$3.97 (1.56) \times 10^2$
3889	The Netherlands	-	-	Swine	$8.20 (3.22) \times 10^4$	$8.53 (4.77) \times 10^2$
4005	The Netherlands	+	+	Swine	$1.10 (0.75) \times 10^5$	$1.54 (0.64) \times 10^3$
89-1591	Canada	+	-	Swine	$1.11 (0.52) \times 10^4$	$2.80 (1.30) \times 10^2$
31533 ^a	France	+	+	Swine	$4.31 (2.30) \times 10^4$	$1.18 (0.33) \times 10^3$

^a Reference strain used in this study

Characterization of PBMEC invasion by *S. suis*. To verify if bacterial proteins play a role in the invasion of PBMECs, bacteria were pretreated with several proteases with different proteolytic activities. As shown in Figure 2, proteinase K, pronase, and trypsin inhibited the invasion of PBMECs by *S. suis* strain 31533 in a dose-dependent manner. Proteases were also used in the adhesion assays. Bacteria treated with 2 mg/mL of proteinase K, 500 µg/mL of pronase, and 4 mg/mL of trypsin showed 53%, 55%, and 29% adhesion to PBMECs, respectively, compared with nontreated bacteria (considered as showing 100% adhesion). None of the proteases affected the bacterial viability at the concentrations used (data not shown). These results provide evidence that proteinaceous adhesins/invasins may be important for the invasion of PBMECs by *S. suis*. However, the specific adhesin(s) involved in *S. suis* interactions with host cells may differ among distinct cell types. Thus, although proteases similar to those used in this study were reported to inhibit the interaction of the Gal α 1–4 Gal-binding P adhesin with erythrocytes (32), these proteases fail to block the adhesion of *S. suis* to J774 macrophages and porcine epithelial cells (20, 25).

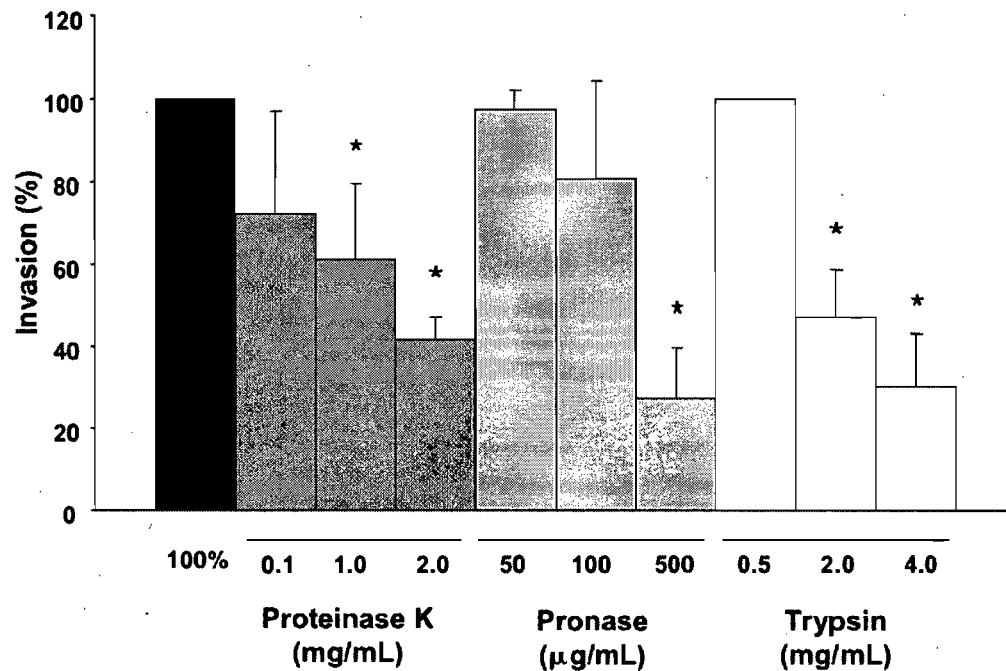


Figure 2. Inhibition of invasion of PBMECs by *S. suis* strain 31533 by pretreatment of the bacteria with the indicated concentrations of proteases at 37°C for 1 h before inoculation of 10^6 CFU/mL. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with the level of invasion without protease treatment (considered as 100%).

Cell wall components have been demonstrated to be responsible for the adhesion of pathogens to endothelial cells (13). Therefore, we investigated whether these components were also involved in the adhesion of *S. suis* to PBMECs. Adhesion was reduced to 44% by pretreatment of PBMECs with 100 µg/mL of purified cell wall, and invasion was inhibited in a dose-dependent manner (Figure 3). Pretreatment of PBMECs with 200 µg/mL of LTA, a cell wall component, reduced adhesion to 43% and inhibited invasion in a dose-dependent manner (Figure 3). Thus, our results suggest that the bacterial cell wall may contain adhesins in addition to proteinaceous adhesins/invasins that mediate interactions between *S. suis* and PBMECs. A previous study also demonstrated a high level of inhibition of bacterial adhesion to porcine epithelial cells with similar doses of *S. suis* purified cell wall (20). Indeed, cell wall components of other streptococcal pathogens, such as *S. pneumoniae* and group A and B streptococci, have been previously described to be responsible for bacterial adhesion to host cells (8, 13,

23). Our results indicate that LTA may play a role in the interactions between *S. suis* and PBMECs. Thus, similar to *S. pyogenes*, *S. suis* could possess multiple adhesins (LTA and proteins) that mediate its interactions with host cells (8).

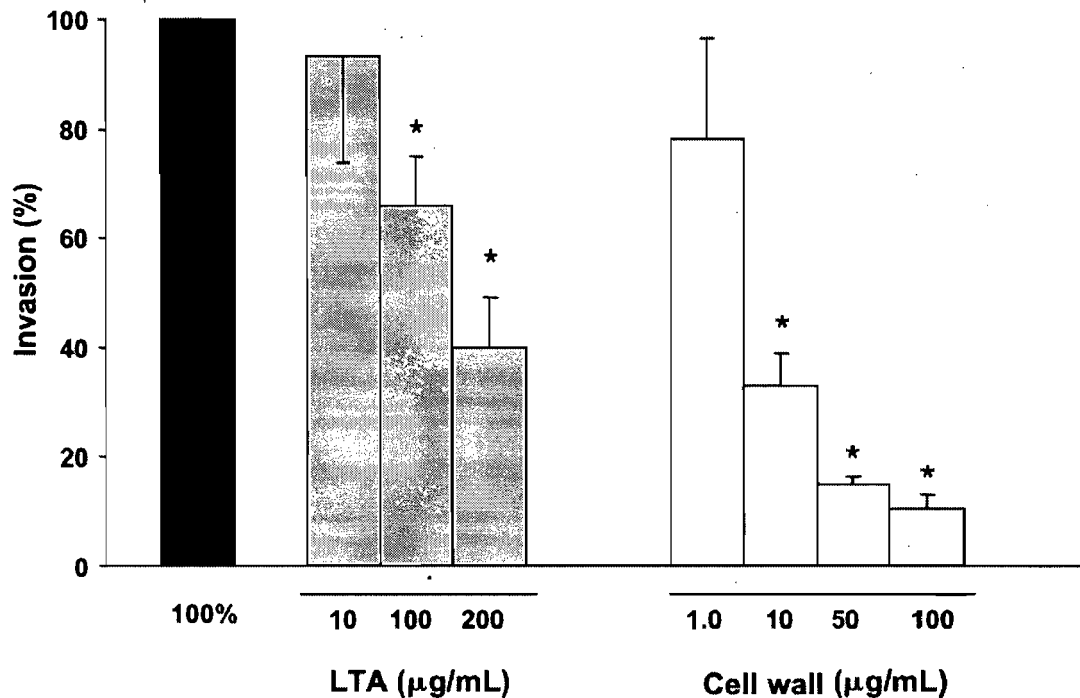


Figure 3. Inhibition of invasion of PBMECs by *S. suis* strain 31533 by pretreatment of the PBMEC monolayers with the indicated concentrations of purified *S. faecalis* lipoteichoic acid (LTA) or purified cell wall at 37°C for 90 and 30 min, respectively, before inoculation of 10^6 CFU/mL. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with the level of invasion without purified bacterial component (considered as 100%).

Since *S. suis* capsule contains sialic acid (15), which has been shown to inhibit adhesion to macrophages (25), PBMECs were also pretreated with sialic acid to determine the role of this capsular component in *S. suis* interactions with PBMECs. Pretreatment with sialic acid did not significantly inhibit invasion at a concentration of 100 μg/mL (data not shown), the concentration that significantly inhibited adhesion of *S. suis* to macrophages (25). Thus, different adhesins may be involved in the adhesion of *S. suis* to distinct types of cells.

Pretreatment of bacteria with human plasma fibronectin induced strong increases in adhesion ($553\% \pm 190\%$) and invasion ($703\% \pm 214\%$) compared with the absence of fibronectin (considered as 100%). As was recently reported, *S. suis*

is able to bind to plasma and cellular fibronectins (12) and possesses a FBPS (10). Our results suggest that *S. suis* uses plasma fibronectin as a bridge between bacteria and the cell surface. Interactions mediated by bridging fibronectin were reported for *Staphylococcus aureus* with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and for *S. pyogenes* with lung epithelial cells (9, 22). However, other pathogens, such as *Enterococcus faecalis*, bind to fibronectin attached to the surface of the target host cell (27).

Interestingly, the described FBPS (10) may not be the only *S. suis* fibronectin-binding protein, since we observed no significant differences in levels of adhesion and invasion between the FBPS mutant and its wild-type strain (data not shown). It is possible that *S. suis* possesses multiple fibronectin receptors, as do other streptococci (8).

To test if serum components play a role in the invasion of PBMECs by *S. suis*, we performed invasion assays in the absence of serum or the presence of different concentrations of FBS or swine serum. An absence of serum or different concentrations of FBS did not significantly affect levels of invasion; however, swine serum significantly increased the level of invasion, in a dose-dependent manner (Figure 4). Serum components (including fibronectin) could act as molecular bridges between the bacteria and cell surface receptor(s). Given its abundance in blood, plasma fibronectin would be readily available for use by circulating *S. suis* (7). However, these factors may not be absolutely necessary for invasion, since *S. suis* was able to invade PBMECs in the absence of serum. It is possible that factors present in FBS (including plasma fibronectin) were not available at sufficient levels to mediate interactions with *S. suis* or were not recognized by *S. suis* owing to their bovine origin. Thus, interactions of *S. suis* with PBMECs likely involve multiple adhesins as well as serum components that act as bridges. Consistent with our results, group A streptococci possess several adhesins of different types that mediate their complex interactions with host cells (8).

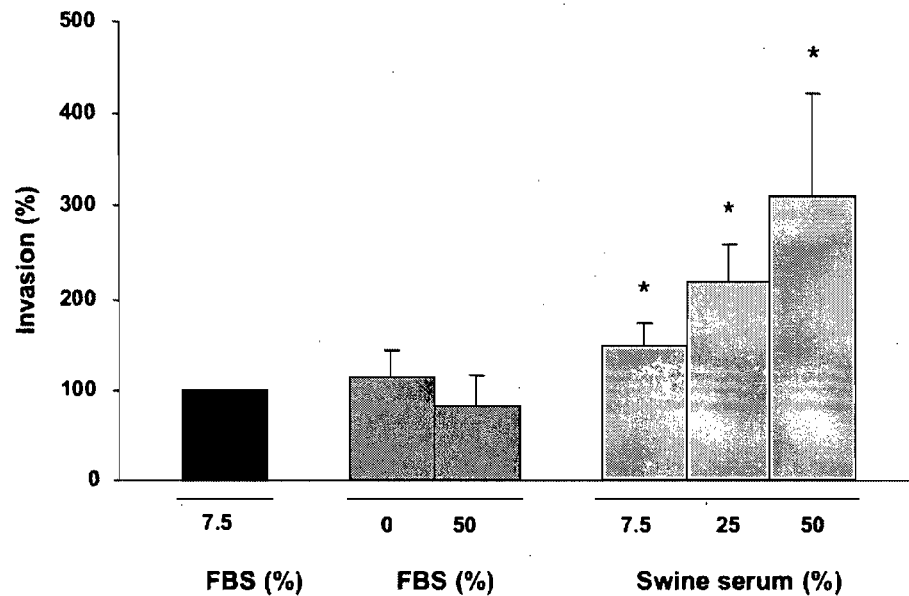


Figure 4. Effect of serum type and concentration on the level of PBMEC invasion by *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/mL). A standard invasion assay was performed in the presence of different concentrations of fetal bovine serum (FBS) or swine serum as well as in the absence of serum. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with the level of invasion with 7.5% FBS (considered as 100% invasion).

Interactions between *S. suis* and pPBMECs. Culturing primary cells is time-consuming, and results obtained from these cells are subject to variation among batches. To overcome these problems, immortalized cell lines are frequently used as in vitro models. However, it was reported that cell immortalization strongly enhanced *Listeria monocytogenes* invasion of cells from the porcine ileum (38). Our results show that this is not the case with *S. suis*. As shown in Figure 5, *S. suis* was able to adhere to and invade pPBMECs. Indeed, strain 31533 showed similar levels of binding to and invasion of both immortalized and pPBMECs, whereas strain 89-1591 showed slightly higher levels of binding and invasion of pPBMECs compared with immortalized PBMECs. In addition, as was previously reported with the PBMEC cell line (36), adhesion to and invasion of pPBMECs depended on bacterial concentration (data not shown). Confirming results obtained with PBMECs (36), a sullysin-negative mutant showed levels of adhesion to and invasion of pPBMECs similar to those observed with the wild-type strain (unpublished observations).

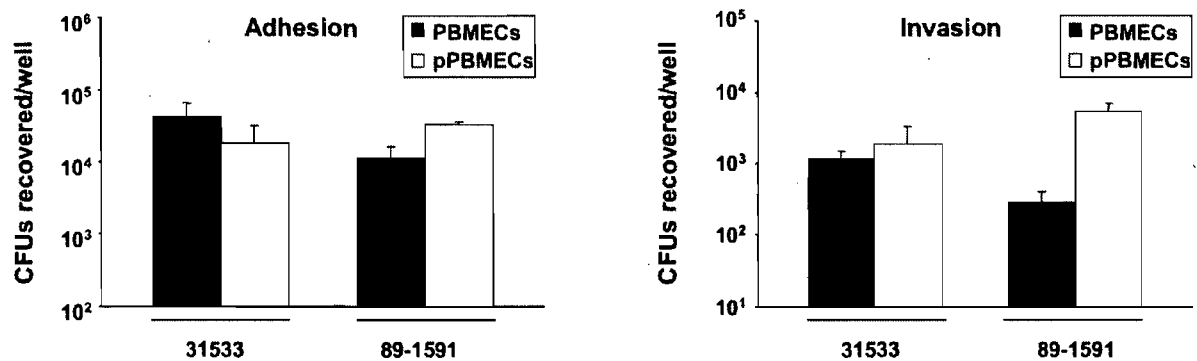


Figure 5. Interactions of *S. suis* strains 31533 and 89-1591 with immortalized PBMECs or primary PBMECs (pPBMECs) 2 h after inoculation of 10⁶ CFU/mL.

Interactions between *S. suis* and PAEC cell lines. Cells from large vessels differ from those of microvascular origin in the expression of receptors and adhesion molecules (29). Moreover, microvascular endothelial cells form tight junctions, whereas the endothelium of large vessels is fenestrated (33). These differences may help explain the observation that group B streptococci invade microvascular endothelial cells at higher levels than pulmonary artery cells (14). It is not known whether the level of invasion by *S. suis* also varies according to the type of blood vessel. Since *S. suis* has been reported to cause diseases in addition to meningitis, such as endocarditis and pneumonia (17), the ability of *S. suis* to adhere to and invade porcine endothelial cells from different tissues may be relevant to bacterial pathogenesis. To investigate this, we inoculated 2 different PAEC cell lines, AOC and PAEC₁₁, with different *S. suis* strains. As shown in Figure 6, *S. suis* adhered to and invaded the 2 cell lines at similar levels, and these interactions depended on the bacterial concentration (data not shown). These results suggest that receptor(s) for interactions between *S. suis* and porcine cells are present in both microvascular endothelial cells from the blood–brain barrier and aortic endothelial cells. Interestingly, these results differ from those obtained with human cells. Our laboratory has previously reported that *S. suis* neither adheres to nor activates HUVECs but is able to adhere to and induce the release of proinflammatory cytokines from human BMECs (6, 34). Therefore, unlike porcine endothelial cells, human BMECs but not HUVECs may have receptor(s) for interactions with *S. suis*. In the present work, similar results were obtained with a

suliyisin-negative mutant and its wild-type strain (unpublished observations). These results are in agreement with those previously reported for PBMECs (36). Taken together, our results demonstrate that suliyisin is not required for *S. suis* interactions with porcine endothelial cells.

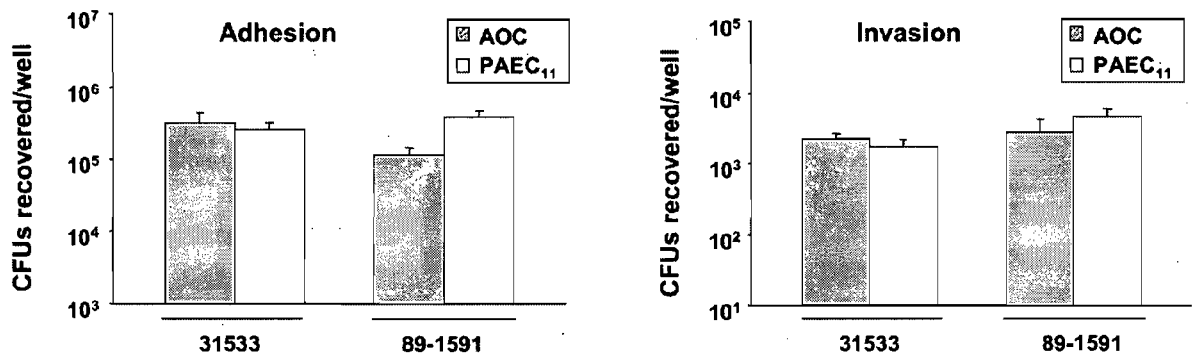


Figure 6. Interactions of *S. suis* strains 31533 and 89-1591 with porcine aortic endothelial cell lines AOC and PAEC₁₁ 2 h after inoculation of 10⁶ CFU/mL.

Survival of bacteria in blood is a critical step to enable the bacteria to access and invade the CNS. There is much evidence that CPS is an important factor that promotes bacterial resistance to phagocytic clearance (5, 28). Compared with its wild-type strain 31533, the nonencapsulated mutant B218 showed higher levels of adhesion to and invasion of AOC ($P < 0.05$; data not shown). Similarly, the levels of adhesion to and invasion of PBMECs were significantly increased in the absence of CPS (36). The higher levels of interactions of nonencapsulated *S. suis* with aortic endothelial cells as well as PBMECs may be attributed to the exposition of cell wall components required for bacterial interaction with receptors present in both cell types. These data, together with those obtained in the inhibition studies (Figures 2 and 3), suggest that CPS is not involved in the adhesion or invasion process and that cell wall components (proteins and LTA, for example) may play an important role in these interactions. Although the ability of the capsule to interfere with bacteria–endothelial cell interactions has been reported for *Haemophilus influenzae* (39) and *S. pneumoniae* (24), encapsulated *S. suis* is still able to interact with host cells, which suggests that adhesins/invasins are exposed at the cell surface.

CONCLUSION

Many questions remain unsolved concerning the pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* serotype 2. One critical gap in our knowledge is the mechanism(s) by which the bacteria enter the CNS (15). Recently, we demonstrated the capacity of *S. suis* serotype 2 to bind to and penetrate immortalized PBMECs (36), and Tenenbaum and associates (31) demonstrated that *S. suis* induces a loss of the blood–cerebrospinal fluid barrier function in an in vitro model. Thus, identifying the mechanisms used by *S. suis* to gain access into the CNS may have a significant impact on our understanding of the pathogenesis of meningitis caused by this bacterium.

Our results suggest that multifactorial mechanisms are used by *S. suis* to interact with PBMECs. These include cell surface protein(s) and cell wall components (mainly LTA) that mediate bacterial adhesion and invasion. Our results also show that *S. suis* is able to interact with endothelial cells derived from various host tissues, suggesting a potential mechanism for bacterial dissemination. Studies are ongoing to further identify the molecules responsible for attachment and subsequent invasion of porcine endothelial cells by *S. suis*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Lacouture and Patricia Pelletier for excellent technical assistance. We are also indebted to Dr. José Yélamos, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain, and Dr. Bernard Weill, Université Paris V, Paris, France, for providing the AOC and PAEC₁₁ cell lines, respectively. We also thank Dr. Astrid de Greeff, Institute for Animal Science and Health, Lelystad, the Netherlands, for providing the FBPS mutant and its wild-type *S. suis* strain. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 0680154280 and by Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec grant 99-ER-0214. Ghyslaine Vanier is the recipient of an NSERC scholarship.

REFERENCES

1. **Berthelot-Herault, F., M. Gottschalk, A. Labbe, R. Cariolet, and M. Kobisch.** 2001. Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol* **82**:69-80.
2. **Berthelot-Herault, F., M. Gottschalk, H. Morvan, and M. Kobisch.** 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Can J Vet Res* **69**:236-240.
3. **Brassard, J., M. Gottschalk, and S. Quessy.** 2004. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* **102**:87-94.
4. **Carrillo, A., S. Chamorro, M. Rodriguez-Gago, B. Alvarez, M. J. Molina, J. I. Rodriguez-Barbosa, A. Sanchez, P. Ramirez, A. Munoz, J. Dominguez, P. Parrilla, and J. Yelamos.** 2002. Isolation and characterization of immortalized porcine aortic endothelial cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* **89**:91-8.
5. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2):325-32.
6. **Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**:637-43.
7. **Chifflet, S., C. Bolatto, and S. Tolosa.** 2004. A rapid method for fibronectin purification on nitrocellulose membranes suitable for tissue culture. *J Biochem Biophys Methods* **59**:139-43.
8. **Courtney, H. S., D. L. Hasty, and J. B. Dale.** 2002. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* **34**:77-87.
9. **Cue, D., P. E. Dombek, H. Lam, and P. P. Cleary.** 1998. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* **66**:4593-601.
10. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **70**:1319-25.
11. **Elliott, S. D., M. McCarty, and R. C. Lancefield.** 1977. Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). *J Exp Med* **145**:490-9.
12. **Esgleas, M., S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* **244**:33-40.
13. **Geelen, S., C. Bhattacharyya, and E. Tuomanen.** 1993. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* **61**:1538-1543.
14. **Gibson, R. L., C. Soderland, W. R. Henderson, Jr., E. Y. Chi, and C. E. Rubens.** 1995. Group B streptococci (GBS) injure lung endothelium in vitro: GBS invasion and GBS-induced eicosanoid production is greater with microvascular than with pulmonary artery cells. *Infect Immun* **63**:271-9.

15. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-72.
16. **Gottschalk, M. G., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141** (Pt 1):189-95.
17. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 2005. Streptococcal Diseases, p. 769-783. *In* B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University, Ames.
18. **Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh.** 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* **107**:63-9.
19. **Jobin, M. C., and D. Grenier.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**:113-9.
20. **Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146** (Pt 8):1913-21.
21. **Malassagne, B., F. Taboit, F. Conti, F. Batteux, N. Atia, C. Chereau, H. Conjeaud, M. C. Theron, J. Attal, F. Braet, L. M. Houdebine, Y. Calmus, D. Houssin, and B. Weill.** 1998. A newly established porcine aortic endothelial cell line: characterization and application to the study of human-to-swine graft rejection. *Exp Cell Res* **238**:90-100.
22. **Massey, R. C., M. N. Kantzanou, T. Fowler, N. P. Day, K. Schofield, E. R. Wann, A. R. Berendt, M. Hook, and S. J. Peacock.** 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**:839-51.
23. **Nealon, T. J., and S. J. Mattingly.** 1985. Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect Immun* **50**:107-15.
24. **Ring, A., J. N. Weiser, and E. I. Tuomanen.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* **102**:347-360.
25. **Segura, M., and M. Gottschalk.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* **70**:4312-22.
26. **Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-54.
27. **Shiono, A., and Y. Ike.** 1999. Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells and inhibition of adhesion by fibronectin and trypsin treatment. *Infect Immun* **67**:1585-92.
28. **Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 1999. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the

- capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* **67**:1750-1756.
29. **Stins, M. F., F. Gilles, and K. S. Kim.** 1997. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* **76**:81-90.
 30. **Teifel, M., and P. Friedl.** 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res* **228**:50-7.
 31. **Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggelpohler, D. Matalon, A. Seibt, G. E. K Novotny, H. J. Galla, and H. Schroten.** 2005. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:25-34.
 32. **Tikkanen, K., S. Haataja, and J. Finne.** 1996. The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect Immun* **64**:3659-65.
 33. **Townsend, G. C., and W. M. Scheld.** 1995. Microbe-endothelium interactions in blood-brain barrier permeability during bacterial meningitis. *ASM News* **61**:294-298.
 34. **Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier, and M. Gottschalk.** 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**:49-58.
 35. **Valentin-Weigand, P.** 2004. Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **117**:459-63.
 36. **Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-9.
 37. **Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* **59**:3156-3162.
 38. **Velge, P., E. Bottreau, B. Kaeffer, and P. Pardon.** 1994. Cell immortalization enhances *Listeria monocytogenes* invasion. *Med Microbiol Immunol* **183**:145-158.
 39. **Virji, M., H. Kayhty, D. J. Ferguson, C. Alexandrescu, and E. R. Moxon.** 1991. Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb Pathog* **10**:231-245.
 40. **Xie, Y., K. J. Kim, and K. S. Kim.** 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* **42**:271-9.
 41. **Yu, H., H. Jing, Z. Chen, H. Zheng, X. Zhu, H. Wang, S. Wang, L. Liu, R. Zu, L. Luo, N. Xiang, H. Liu, X. Liu, Y. Shu, S. S. Lee, S. K. Chuang, Y. Wang, J. Xu, and W. Yang.** 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:914-20.

ARTICLE III

**Porcine Brain Microvascular Endothelial Cell-derived
Interleukin-8 is first induced and then degraded by
*Streptococcus suis***

Ghyslaine Vanier^{1,2}, Mariela Segura^{1,2}, Marie-Pier Lecours^{1,2}, Daniel Grenier^{2,3},
and Marcelo Gottschalk^{1,2,*}

*Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP)¹, and
Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP)², Faculté de médecine
vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Qc, J2S
2M2, Canada, and Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Université Laval,
Québec, Qc, G1K 7P4 Canada³*

Manuscrit en préparation

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé activement à la conception et au désign expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Streptococcus suis is a major pathogen of swine which causes mainly meningitis and is an emerging zoonotic agent. In this study, we investigated the ability of *S. suis* to induce the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines by porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC) from the blood-brain barrier (BBB). We demonstrated that live *S. suis* induced a strong release of interleukin (IL)-6 and IL-8 by PBMEC. Using various purified component and strains of *S. suis* serotype 2, we showed that the hemolysin toxin, suilysin, was largely responsible for such stimulation and the cell wall contributes to cell stimulation but to a lower extent. Interestingly, IL-8 production became undetectable by increasing the incubation time of cells in the presence of several *S. suis* strains. This effect was more marked with rising concentrations of live *S. suis*. Indeed, we further demonstrated that these decrease of IL-8 levels was linked to the production of a secreted serine protease by *S. suis*. Our results suggest that *S. suis* can induce an exacerbated release of inflammatory mediators by swine BBB endothelial cells that could cause a massive recruitment of leukocytes and subsequent BBB breakdown facilitating the pathogenesis of *S. suis* induced meningitis. In addition, *S. suis* could modulate this response by degrading IL-8 which might delay recruitment of *S. suis* killer-neutrophils to the site of inflammation, allowing this pathogen to survive upon its arrival to CNS.

INTRODUCTION

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine bacterial pathogen associated mainly with meningitis but also with other infections such as septicemia, endocarditis, and arthritis (25). Of the 35 serotypes described, serotype 2 is the one most frequently associated with disease (25). This organism is also recognized as an emerging zoonotic agent with a rising incidence in human over the last years, especially in China, Thailand and Vietnam (21, 35, 37). In humans, *S. suis* is mainly associated to cases of meningitis and streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLS) (21, 55). In 2005, an important outbreak in China resulted in more than 200 human cases (mainly STSLS cases) from which 20% were fatal. This outbreak was directly linked to a concurrent outbreak of *S. suis* infection in pigs (57).

Several virulence factors have been proposed to be involved in *S. suis* pathogenesis of the infection. A hemolysin, named "suilysin" (22), has been involved in the modulation of *S. suis* interactions with host cells (7, 44, 53). The suilysin possesses a multi-hit mechanism of action and belongs to the thiol-activated cholesterol-binding cytolysin family (22, 41). In addition to the suilysin, a serum opacity factor (OFS) (3), a fibronectin- and fibrinogen-binding protein (FBPS) (14), adhesins (5), different proteases (28), and other proteins (54) have been proposed. However, there is confusion in the literature about the description of *S. suis* virulence and the role of these factors has not been clearly established (19, 20). Indeed, only the capsular polysaccharide (CPS) (8) has been proven to be important for virulence.

Several questions about the pathogenesis of *S. suis* infection remain unanswered. One of these is how the pathogen reaches the central nervous system (CNS) to cause meningitis in swine. It has been suggested that this key step could be achieved by crossing the porcine blood-brain barrier (BBB) by transcytose through porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC) (53) and/or porcine choroid plexus epithelial cells (PCPEC) (50), as well as by disruption of the barrier caused by toxic effects of suilysin on BBB forming cells (9, 53). In addition, inflammation of the CNS seems to play an important role in the pathogenesis of *S. suis* infection (47). Hence, up-regulated expression of pro-inflammatory mediators and leukocyte trafficking, might also contribute to increased BBB permeability (20). Human BMEC have been shown to produce interleukin (IL)-6, IL-8 (CXCL8), and monocyte chemotactic protein (MCP)-1(CCL2) following activation by *S. suis* (52). Moreover, *S. suis*-infected human monocytes have been reported to secrete tumour necrosis factor (TNF)- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 and to up-regulate the expression of adhesion molecules which increases their adhesion to endothelial cells (2), thus modulating leukocyte infiltration. However, no studies have addressed the capacity of *S. suis* to up-regulate inflammatory mediators by the intermediary of BBB endothelial cells from the natural host, the swine.

In the present study, we used PBMEC to investigate the induction of pro-inflammatory cytokines and chemokines by *S. suis* and to determine the contribution of different bacterial components to cytokine secretion. Our results suggest that *S. suis* serotype 2 is able to induce, at first, the production of IL-6 and

IL-8 from PBMEC, and that this activation is mainly mediated through the secretion of the suilysin. After this first step that increases inflammation at the CNS, *S. suis* would later produce a protease that is able to degrade IL-8, consequently delaying recruitment of neutrophils to the site of inflammation, allowing this pathogen to survive and to cause damage.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Strains used in this study are listed in Table 1. Strain 31533 is a representative virulent European suilysin-positive *S. suis* serotype 2 strain already used in most of our previous studies (16, 45, 46, 52). Two mutants derived from this strain (B218, an unencapsulated mutant (8) and SX911, a suilysin-negative mutant (34)) were also tested. For comparative purposes, several other *S. suis* serotype 2 strains of known origin and phenotype were tested. Bacteria were grown as previously described for 16 h (53), and were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.3), and were appropriately diluted in cell culture medium before infection. An accurate determination of the number of colony forming units per milliliter (CFU/ml) in the final suspension was made by plating onto Todd Hewitt Broth (THB; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) agar using Autoplate[®] 4000 (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA). In selected experiments, heat-killed bacterial suspensions were used for stimulation assays. Heat-killed bacteria were produced as described previously by incubating organisms at 60°C for 45 min, which is the minimal condition required to kill *S. suis* cultures (45). Killed bacterial preparations were stored in PBS at 4°C, and the required number

of bacteria was resuspended in cell culture medium immediately before stimulation assays.

TABLE 1. *Streptococcus suis* strains used in this study

<i>S. suis</i> strains		Description		Source
31533	France	Diseased pig	sly +	(32)
NCTC 10234 ^a	The Netherlands	Diseased pig	sly +	(31)
P1/7	United Kingdom	Diseased pig	sly +	
D282	The Netherlands	Diseased pig	sly +	
24	France	Diseased pig	sly +	
166'	France	Diseased pig	sly +	
SX332	United States	Diseased pig	sly +	
95-8242	Canada	Diseased pig	sly +	
LEF95	France	Human, meningitis	sly +	
H11/1	United Kingdom	Human, meningitis	sly +	
89-1591	Canada	Diseased pig	sly -	(4)
98-8993	Canada	Diseased pig	sly -	
98-B099	Canada	Diseased pig	sly -	
89-999	Canada	Diseased pig	sly -	
AAH4	United States	Diseased pig	sly -	
90-1330	Canada	Diseased pig	sly -	
TD10	United Kingdom	Healthy pig	sly -	
94-623	France	Healthy pig	sly -	
T15	The Netherlands	Healthy pig	sly -	
3889	The Netherlands	Healthy pig	sly -	
AR770353	The Netherlands	Human, meningitis	sly -	
B218	Nonencapsulated mutant from 31533			(8)
SX911 ^b	Non-hemolytic mutant from 31533			(34)

^aATCC 43765 *S. suis* type 2 reference strain.

^bMutant SX911 was grown in the presence of 200 mg/ml of spectinomycin (Sigma-Aldrich).

Bacterial components. Purified CPS and purified cell wall of *S. suis* serotype 2 were prepared as previously reported (15, 45) and were used at 100 µg/ml. Purified *S. suis* lipoteichoic acid was a gift from S. Von Aulock (University of Konstanz, Germany) and was used at 100 µg/ml. Purified sulysin was kindly

provided by A. Jacobs (Intervet International, Boxmeer, The Netherlands) and activated by addition of 0.1% 2 β -mercaptoethanol before its use at 100 ng/ml. Ultra-purified *Escherichia coli* O55:B5 lipopolysaccharide (LPS) (Apotech Corp, Epalinges, Switzerland) was used at 10 μ g/ml as a positive control for stimulation assays.

Cell culture. The PBMEC/C1-2 cell line (49) was cultivated as previously described (53). Briefly, cells were grown in complete IF medium, which is a mixture of 1:1 Iscove's modified Dulbecco's medium and Ham's F-12 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 7.5% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum, penicillin-streptomycin (Invitrogen), sodium bicarbonate, L-glutamine, human transferrin (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), N-acetylcysteine, hypoxanthine, porcine heparin, human recombinant fibroblast growth factor-basic (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), and β -mercaptoethanol (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Flasks (Falcon; Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) and 24-well tissue culture plates (Primaria, Falcon) were precoated with 1% (w/v) type A gelatin from porcine skin (Sigma) to support the cells. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humid atmosphere. For assays, PBMEC, were trypsinized by adding a trypsin-EDTA solution (Invitrogen) and diluted in culture medium at 8×10^4 cells/ml. The cell suspension was distributed in tissue culture plates and incubated to confluence. Before the experiments, medium was removed from plates and replaced by medium without antibiotics.

Cell stimulation. Bacteria (at different concentrations) or purified components diluted in complete IF medium supplemented with 25% complete swine serum were added to the cell monolayer. Plates were then centrifuged at $800 \times g$ for 10 min and incubated at 37°C in 5% CO_2 . Stimulated or unstimulated (control) samples were harvested at 6, 12, 24, and 48 h and supernatants were aliquoted and frozen at -20°C until analysis. Cells incubated in medium alone served as controls for spontaneous cytokine release. In inhibition assays, live strain 31533 was added in combination with ethanol-soluble cholesterol (Sigma-Aldrich) at $2 \mu\text{g/ml}$. Similar inhibitory condition was previously established in our laboratory and do not affect either cell or bacterial viability (9, 44). At least 3 independent experiments (stimulation assays) were carried out.

Cytokine quantification by ELISA. IL- 1β , TNF- α , IL-6, and IL-8 were measured by ELISA using porcine specific pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant porcine IL- 1β (100 to 6000 pg/ml, R&D Systems) TNF- α and IL-6 (78 to 5000 pg/ml, R&D Systems) and porcine IL-8 (18 to 1200 pg/ml, R&D Systems) were used to generate standard curves. Sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. Standard and sample dilutions were added in duplicate wells to each ELISA plate (Nunc, VWR, Ville Mont Royal, QC, Canada), and all analysis were performed at least four times for each individual stimulation assay. Plates were read in a Molecular Devices UVmax (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA) microplate reader. For each incubation time, basal cell production of cytokines was

corrected from the production level obtained after incubation with *S. suis* or its components to represent the specific induced levels of production only.

Endotoxin contamination. All solutions and bacterial preparations used in this study were tested for the presence of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) gelclot test (Pyrotell STV, Cape Cod, Falmouth, MA, USA) with a sensitivity limit of 0.03 EU ml. In some experiments, endotoxin contamination during stimulation of endothelial cells was controlled by parallel assays with polymixin B (10 µg/ml) from Sigma-Aldrich. Results from the LAL test and/or data from polymixin B treatment demonstrated no significant levels of endotoxin contamination from different bacterial preparations (data not shown).

IL-8 degradation assay. Bacteria were grown in THB to reach the exponential growth phase as for the stimulation assay and culture supernatants were obtained by centrifugation at 4000 × g for 20 min, and filtration using 0.22 µm filters (Millipore Billerica, MA, USA). Then, supernatants were freshly used for IL-8 degradation assays. For this, porcine recombinant IL-8 (R&D Systems) diluted in culture IF medium, to mimic the environmental conditions from the cell stimulation assay, at a final concentration of 10 ng/ml was incubated with bacterial supernatant or THB, as control, for 6 and 9 h at 37°C at a final ratio of 1:10. After incubation, this mixture was frozen at -70°C for further analysis by ELISA as described above.

To confirm the identity of the *S. suis* protease, in selected experiments, the bacterial supernatant was pre-incubated for 30 min at 37°C with the following protease inhibitors: Pefabloc SC (4 mM, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), which irreversibly blocks serine proteases (trypsin, chymotrypsin, plasmin,

thrombin, and kallikrein); aprotinin (10 µg/ml, Roche), which inhibits kallikrein, trypsin, trypsinogen, chymotrypsin, and plasmin. In addition, the assay was performed in the presence of complete Mini protease inhibitor cocktail tablets (Roche), which efficiently inhibit serine, cysteine and metallo-proteases, according to the manufacturer's recommendations. Residual IL-8 content was measured by ELISA.

SDS-PAGE and Western blotting. To visualize IL-8 degradation by *S. suis*, a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was also used. Briefly, a 16 h- *S. suis* NCTC 10234 strain culture was used to inoculate a fresh THB medium (1/10, v/v) and incubated until it reached an optical density at 600 nm of 0.25. Then, bacteria were washed once with PBS, resuspended in cell culture IF medium containing 0.1% of foetal bovine serum to a quarter of their original volume and incubated for an additional hour at 37°C to reach the exponential growth phase. Supernatant was obtained after centrifugation at 4000 × g for 20 min, and filtrated using 0.22 µm filters (Millipore Billerica). Then, *S. suis* supernatant or cell culture medium were incubated with 5 µg/ml rIL-8 in presence of 20 mM of 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) pH 7.2 (23) for 20 h to allow visualization of band disappearance by silver staining and western blotting. After 20 h of incubation, samples were boiled for 5 min in sample buffer containing SDS before being subjected to 17.5% SDS-PAGE. Proteins bands were visualized either by non-oxydative silver staining or by western blotting. For immunoblotting, gels were electroblotted onto 0.2 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After 1 h of blocking in Tris-buffered saline–NaCl (10 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.4) –2% non-fat dry milk, membranes were washed and incubated 2 h at RT with

polyclonal anti-porcine IL-8 antibody (R&D Systems). After a washing step, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and proteins bands were visualized by adding 3.3 mM 4-chloro-1-naphthol in cold methanol with 0.003% (v/v) hydrogen peroxide in Tris-buffered saline–NaCl. The reaction was stopped by washing the nitrocellulose blot into water.

Statistical analysis. Each cell stimulation assay and ELISA was performed at least in triplicate, and each sample was analyzed in duplicate in ELISA assay. All data are expressed as means \pm standard deviations (error bars). Data were analyzed by two-tailed, unpaired *t* test. A $P < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

Kinetics and dose-response of cytokine secretion. The stimulation of PBMEC with live suilysin-positive *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/ml) or LPS (10 μ g/ml, positive control) resulted in time-dependent IL-6 and IL-8 release (FIG. 1A and B). For IL-6, stimulation with live (10^3 to 10^7 CFU/ml) *S. suis* strain 31533 was dose-dependent and reached a plateau at 10^5 CFU/ml (FIG. 1C). However, a bell-shaped response was observed for IL-8 with peak of production at 10^5 CFU/ml of live *S. suis* strain 31533 (FIG. 1D).

Neither production of IL-1 β nor of TNF- α was observed above the limits of detection of the ELISA test even after stimulation of PBMEC with high doses of *S. suis* or LPS (data not shown). It should be noted that no cytotoxicity effects were observed at the bacterial doses used in the present study (data not shown) (53)

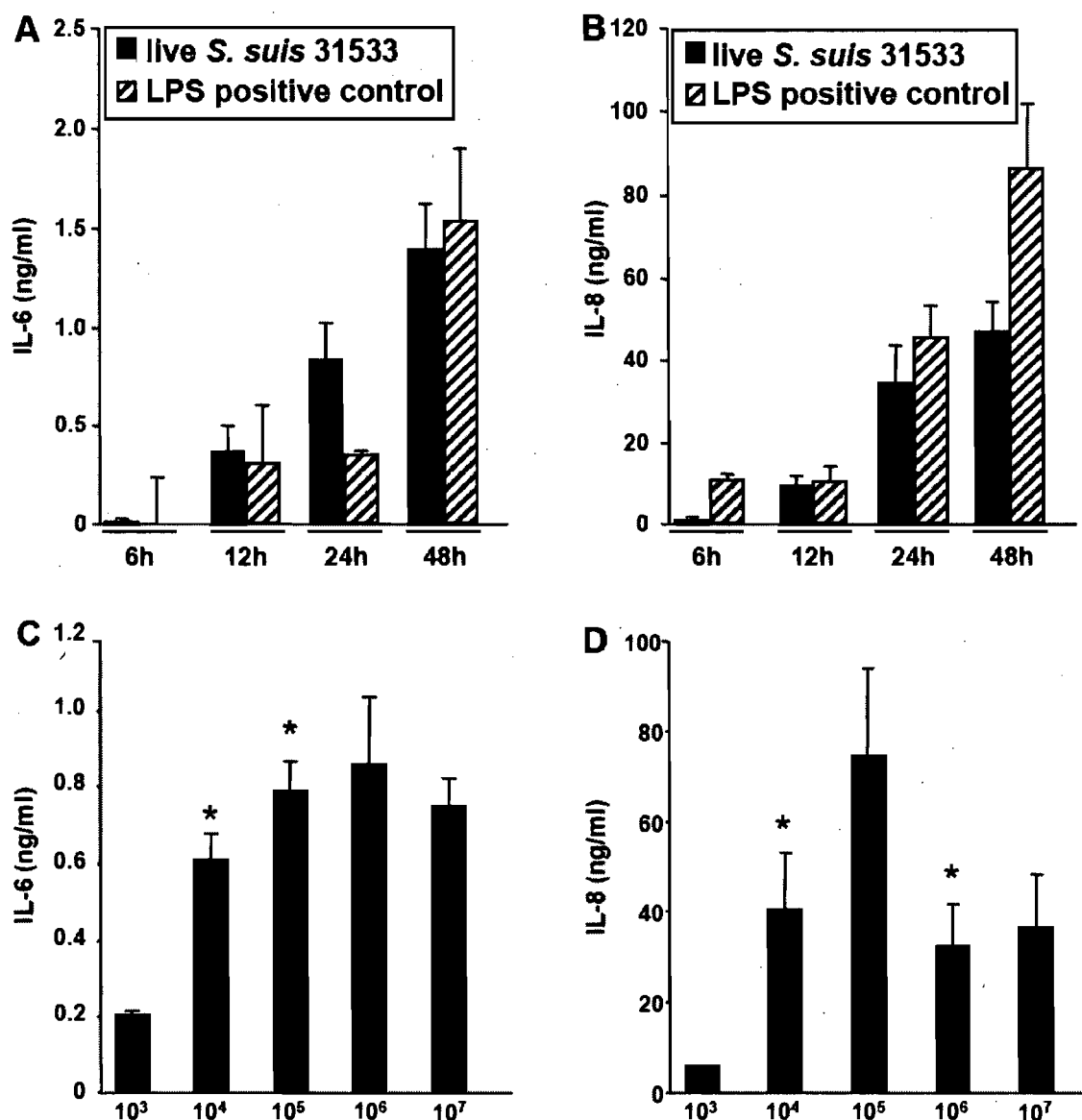


FIG. 1. Kinetics of (A) IL-6 and (B) IL-8 release by PBMEC stimulated by live (10^6 CFU/ml), *S. suis* strain 31533 or positive control *E. coli* O55:B5 LPS (10 μ g/ml). Effect of live *S. suis* strain 31533 concentration on IL-6 (C) and IL-8 production (D) by PBMEC after 24 h of incubation. * denotes values that are significantly different ($P < 0.05$) from those obtained with the preceding lower concentration of live bacteria. Unstimulated cells were used as control for basal production which was corrected from each experimental data obtained after stimulation. Data are expressed as the mean \pm SD in ng/ml of cytokine secretion as measured from supernatants using ELISA.

Role of bacterial components on cytokine production. Purified *S. suis* CPS, cell wall (CW) and lipoteichoic acid (LTA) were used to evaluate their relative contribution to IL-6 and IL-8 production at selected doses based on our previous

publications (47, 52). In addition, the nonencapsulated mutant strain B218, derived from the wild-type strain 31533, was used to stimulate PBMEC. After 24h of incubation, the nonencapsulated mutant B218 showed a significantly higher ability to induce the expression of IL-6 and IL-8 in comparison to its encapsulated wild-type strain 31533 ($P < 0.0001$; FIG. 2). Moreover, the higher level of PBMEC stimulation induced by mutant B218 was observed at all incubation times tested (6 to 48h) (data not shown). Purified CPS was shown to be a weak cytokine inducer (FIG. 2) and probably partially interferes with the stimulation capacity of the bacterial CW in the wild-type strain 31533. Exposed CW in mutant B218 was probably partially responsible for this higher activation since purified CW also stimulated PBMEC to release both cytokines at levels similar to those observed with the wild-type strain (FIG 2). However, purified LTA failed to induce the release of IL-6 or IL-8 by PBMEC (FIG. 2).

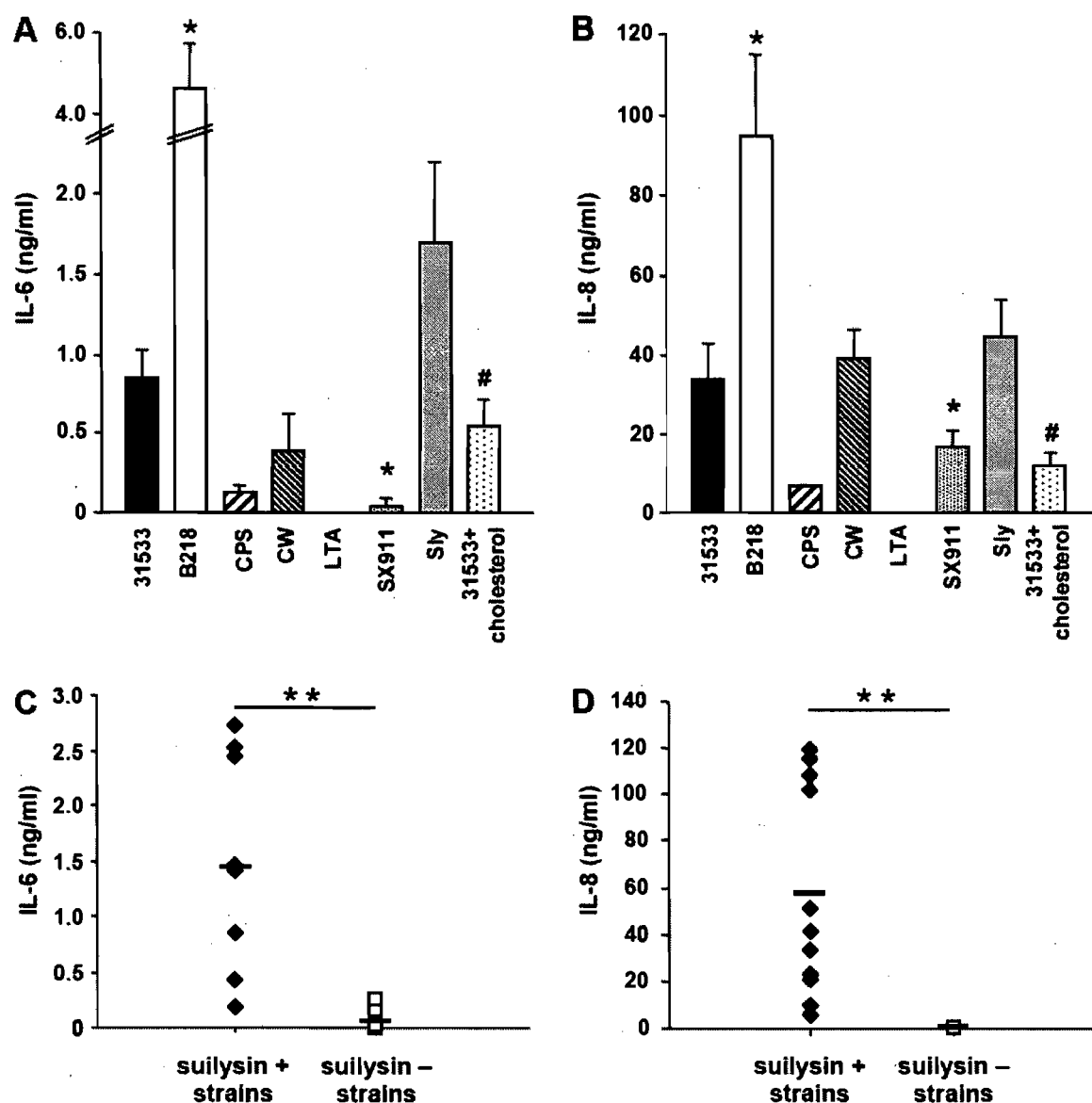


FIG. 2. Contribution of different bacterial components to (A) IL-6 and (B) IL-8 production by PBMEC stimulated with live *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/ml), live nonencapsulated mutant B218 (10^6 CFU/ml), CPS (100 μ g/ml), CW (100 μ g/ml), LTA (100 μ g/ml), live suilysin-negative mutant SX911 (10^6 CFU/ml), suilysin (100 ng/ml), or live *S. suis* strain 31533 (10^6 CFU/ml) in presence of 2 μ g/ml of cholesterol. Data are expressed as the mean \pm SD in ng/ml of cytokine secretion at 24 h post-stimulation as measured from supernatants using ELISA. * denotes values obtained with the mutant strains that are significantly different ($P < 0.05$) from those obtained with the wild-type strain 31533 alone. # denotes significant differences between cholesterol treated vs non-treated 31533 strain. Comparative study of IL-6 (C) and IL-8 (D)-release by PBMEC stimulated for 24 h with different live *S. suis* serotype 2 strains (10^6 CFU/ml). PBMEC were stimulated by live suilysin-positive (black diamond, $n=11$) and suilysin-negative (white squares, $n=10$) strains listed in Table 1. Lines represent mean IL-8 production for each group of strains. ** denotes mean IL-8 levels that are significantly different ($P < 0.05$) from each other.

The role of *S. suis* suilysin was evaluated using the non-hemolytic mutant strain SX911 derived from strain 31533. Surprisingly, and in comparison with its wild-type strain, mutant SX911 induced almost no IL-6 response and a weak IL-8 response by PBMEC ($P < 0.05$, FIG. 2). Accordingly, purified suilysin induced high levels of IL-6 and IL-8 (FIG. 2). To confirm the role of suilysin in the induction of cytokine release, PBMEC were stimulated with strain 31533 in the presence of ethanol-soluble cholesterol, known to bind and block suilysin activity (9, 26, 44). Under these conditions, a significantly lower release of both cytokines was observed after 24h of PBMEC stimulation ($P < 0.05$, FIG. 2).

To further delineate the role suilysin in the induction of cytokine production, different suilysin-positive and negative strains, listed in Table 1, were tested. After 24h of incubation, suilysin-positive strains induced a significantly stronger IL-6 and IL-8 response than suilysin-negative strains ($P = 0.0001$ and 0.0004 , respectively) (FIG. 2C-D) confirming data described above (FIG. 2A-B).

Some *S. suis* strains show a cytokine induction pattern suggesting IL-8 degradation. Due to the bell-shaped IL-8 response obtained with different bacterial concentrations (FIG. 1D), the induction of this cytokine by field strains was also studied at 12 , 24 and 48 h of incubation. Interestingly, different patterns of stimulation were observed for IL-8, which differed upon the incubation times. After 24h or 48h of incubation, while IL-8 production induced by some strains continued to rise, IL-8 release induced by others decreased to basal levels (representative strains shown in FIG. 3A). One of the latter was the *S. suis* reference strain of serotype 2, NCTC 10234 (31). More in details, FIG 3B shows

live NCTC 10234-induced IL-8 level, which reaches its maximum at 12h of incubation and then showed progressive diminution to reach basal production level at 48 h. Surprisingly, when heat-killed NCTC 10234 was used, an increased production of IL-8 was observed over time with maximal production at 48h, which was in marked contrast to the kinetics observed with live bacteria (FIG. 3B). Furthermore, when different concentrations of live NCTC 10234 were used to stimulate PBMEC, a strongly accentuated bell-shaped IL-8 response was observed, which peaked at 10^4 CFU/ml and was almost negative at 10^6 and 10^7 CFU/ml (FIG. 3C). As mentioned above, this effect was not related to bacterial cytotoxic effects (data not shown).

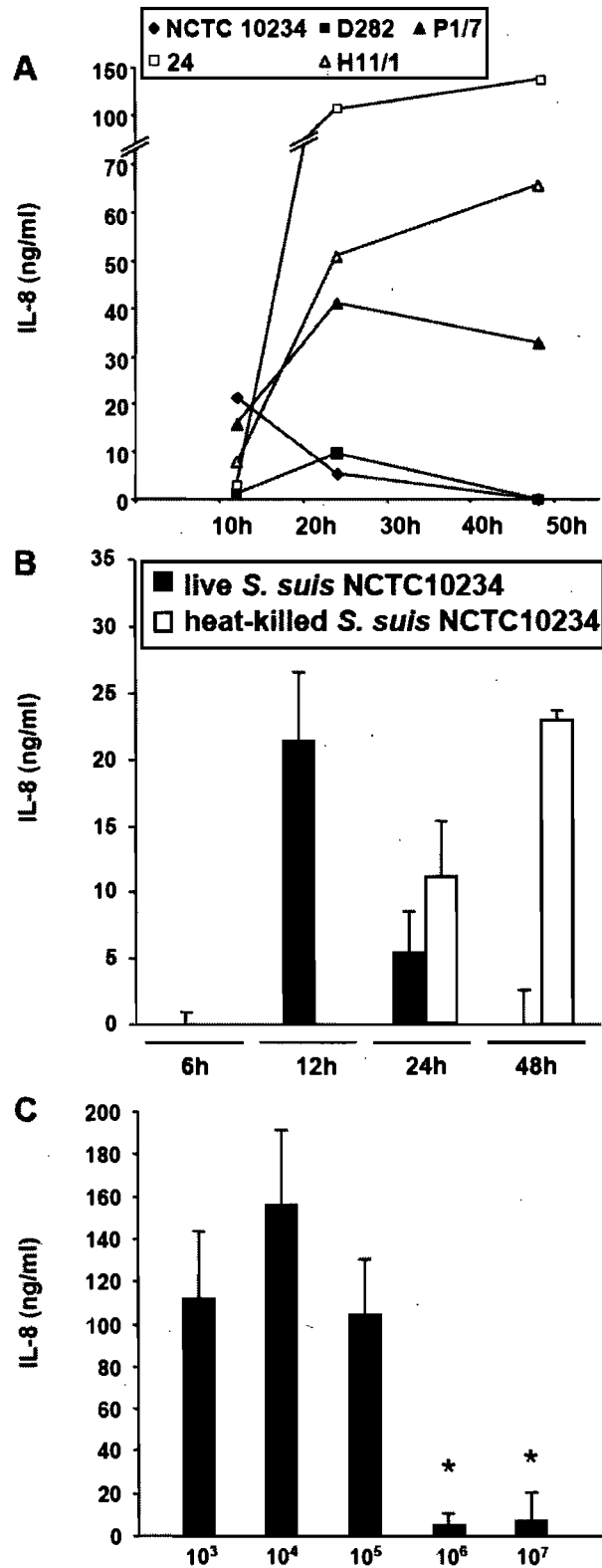


FIG. 3. (A) Kinetics of IL-8 release by PBMEC stimulated with live (10^6 CFU/ml) *S. suis* representative serotype 2 strains. (B) Kinetics of IL-8 release by PBMEC stimulated with live (10^6 CFU/ml) (black bars), and heat-killed (10^9 CFU/ml) (white bars) *S. suis* strain NCTC 10234. (C) Effect of live *S. suis* strain NCTC 10234 concentration on IL-8 production by PBMEC after 24 h of incubation. IL-8

production was measured by ELISA titration of stimulated cell supernatants.* denotes values that are significantly different ($P < 0.05$) from those obtained with the 10^4 concentration of live bacteria. Data are expressed as the mean \pm SD in ng/ml.

IL-8 degradation. Data mentioned above prompted us to test whether some *S. suis* strains could possess a proteolytic activity that might be responsible for IL-8 degradation. In order to verify possible IL-8 degradation, induction of IL-8 by LPS was used as a reporter system. Positive control LPS (10 μ g/ml) alone and LPS in combination with live *S. suis* strain NCTC 10234 (10^6 CFU/ml) were used to stimulate PBMEC. Figure 4 shows a time-dependent decrease in LPS-induced IL-8 levels in presence of live *S. suis* strain NCTC 10234 after 24 and 48h ($P < 0.05$) that is consistent with results obtained from kinetics of IL-8 production with live *S. suis* strain NCTC 10234.

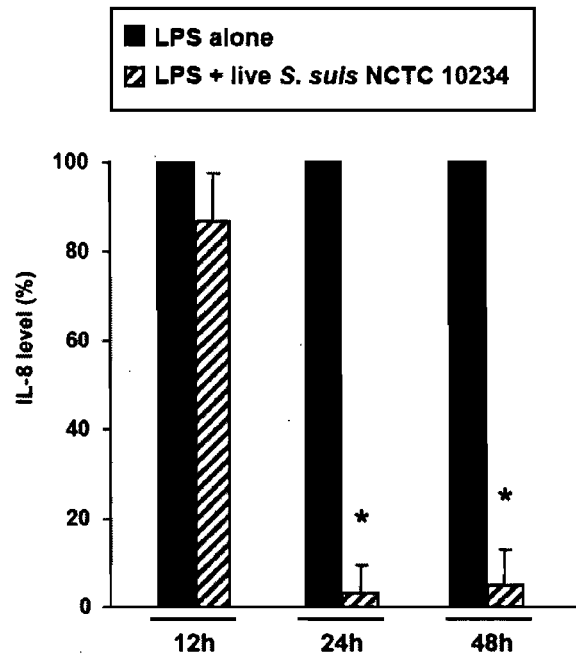


FIG. 4. Kinetics of IL-8 release by PBMEC stimulated with positive control ultra-purified *E. coli* O55:B5 LPS alone (10 µg/ml) (black bars) and LPS along with live *S. suis* strain NCTC 10234 (10^6 CFU/ml) (hatched bars), from a representative experiment. * denotes IL-8 levels that are significantly different ($P < 0.05$) from those obtained using ultra-purified *E. coli* O55:B5 LPS alone (considered as 100%).

Following incubation of swine recombinant IL-8 with supernatant of strain NCTC 10234, a time-dependent decrease of rIL-8 was detected using ELISA (FIG. 5) compared to rIL-8 level observed after incubation with THB alone. In addition, the degradation assay was performed in the absence and presence of class specific protease inhibitors. Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, aprotinin, and Pefabloc SC significantly inhibited IL-8 degradation (FIG. 5) suggesting that the protease responsible for such degradation is of the serine class.

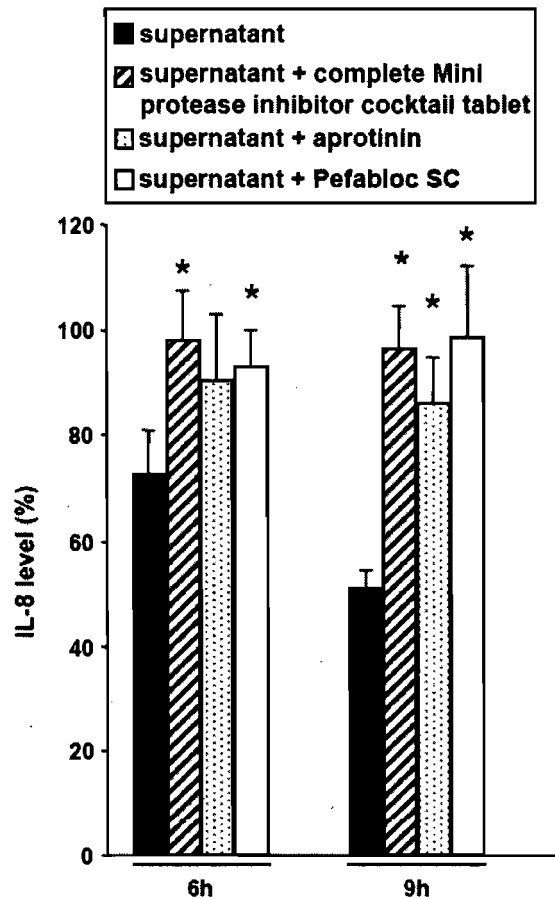


FIG. 5. Swine recombinant IL-8 degradation following incubation with supernatant from *S. suis* strain NCTC 10234 grown for 16 h (black bars), or with supernatant together with complete Mini protease inhibitor cocktail tablets (hatched bars), aprotinin (dotted bars), or Pefabloc SC (white bars). Data are expressed as percentage of residual IL-8 where 100% is the amount of IL-8 detected by ELISA following 6 and 9 h of incubation in THB (control). * denotes values that are significantly different ($P < 0.05$) from residual IL-8 detected following incubation with supernatant from *S. suis* strain NCTC 10234 alone.

Finally, using SDS-PAGE followed by silver staining or Western blotting with polyclonal anti-porcine IL-8 antibody, disappearance of ~9 kDa porcine rIL-8 was observed following incubation with supernatant of strain NCTC 10234 (FIG. 6). It should be noted that recombinant TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were also incubated with supernatant from strain NCTC 10234 and no degradation was observed (data not shown).

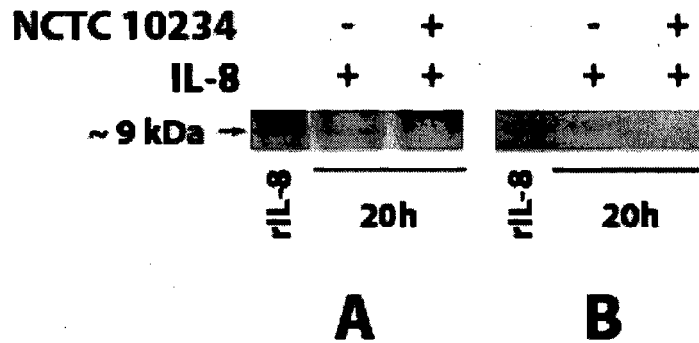


FIG. 6. Porcine recombinant IL-8 (~9 KDa) cleavage by supernatant from *S. suis* strain NCTC 10234 after 20h of incubation. (A) Silver stained SDS-PAGE. (B) Western blotting. + or -, presence or absence of supernatant from *S. suis* prepared in IF culture medium or rIL-8 diluted in cell culture medium and incubated for 20 h. rIL-8 indicates non-incubated rIL-8 directly from the manufacturer.

DISCUSSION

Despite recent advances over the past years, there are still important gaps in our knowledge of the pathogenesis of swine meningitis caused by *S. suis*. However, the passage throughout the BBB by the bacteria to reach the CNS is considered as a crucial stage in this complex process. We recently demonstrated that *S. suis* is able to invade BBB-forming PBMEC and to induce cellular damage by means of its toxin, suilysin, at high bacterial concentrations only (53). These findings suggest that BBB may be the portal of entry for the bacteria into the brain. In fact, *S. suis* is commonly recovered from brains of diseased pigs with clinical signs of meningitis (36). Moreover, microscopic analysis of *S. suis*-infected mouse brain sections showed that cells expressing transcripts for Toll-like receptor 2, CD14, I κ B α (an index of NF- κ B activation), and MCP-1 were associated with microvascular vessels early after infection, suggesting that endothelial cells play an important role in the pathogenesis of *S. suis*-related meningitis (16).

Inflammation produced by cells from the innate immune system can be considered as a two-sided medal. Then, even if this inflammatory response is necessary to overcome an acute infection, it can potentially contribute to immune-mediated pathology. Well-documented examples for this downside are uncontrolled bacteria-induced meningeal inflammation (33) and septic shock with consequent clinical deterioration (51). Suppurative or fibrinopurulent histopathological lesions in the brain, heart, lungs and serosae have been reported in *S. suis* infections (42). During meningitis, microglial, monocytic cells, and migrating leukocytes could be the source of pro-inflammatory cytokines in the cerebrospinal fluid. We have previously reported that *S. suis* stimulates the release of pro-inflammatory cytokines by human and murine cells (45, 46, 52). More recently, we reported release of inflammatory mediators by cells from swine whole blood, namely monocytes, neutrophils and lymphocytes (47). Monocytes stimulated with *S. suis* also expressed adhesion molecules, that could facilitate leukocyte transmigration through endothelial cells from BBB (2). Moreover, it was recently shown that *S. suis* induces the release of arachidonic acid by human BMEC (27). Nevertheless, no studies have been conducted concerning a putative passage through swine BBB that could be facilitated by uncontrolled inflammation and massive leukocyte recruitment.

As a well known endogenous pyrogen and an inducer of acute-phase response, IL-6 also display several pro-inflammatory properties such as maturation and activation of neutrophils and macrophages, and differentiation and maintenance of cytotoxic T cells and natural killer cells (1, 56). IL-8 is a CXC chemokine and a potent chemotactic factor for neutrophils (polymorphonuclear

cells, PMN) and T lymphocytes, a PMN activator and an adhesion molecule inducer on PMN and endothelial cells (40). Results obtained in this study showed that *S. suis* does stimulate BBB-forming PBMEC to release these pro-inflammatory mediators. Hence, PBMEC released detectable levels of IL-6 and IL-8 after contact with most of *S. suis* strains used in this study. The time and dose-dependent release of IL-6 by *S. suis*-stimulated PBMEC was similar to the reported IL-6 production by other cell types stimulated by *S. suis* (46, 52).

Purified cell wall material was observed to be a potent inducer of cytokines and the presence of the CPS seemed to interfere with this activity. This is in agreement with our previous observations with murine macrophages (45) and human BMEC (52) indicating that cell wall components are potent stimuli for cytokine release by infected cells. Surprisingly, LTA from *S. suis* did not induce cytokine secretion by PBMEC. These results diverge from those obtained in others studies demonstrating that LTA of Gram-positive (48) bacteria possess high inflammatory capacity. However, a recent report from Draing *et al.* (17) showing that LTA stimulation activity depends on its surface presentation could explain our results since we used LTA in solution to stimulate PBMEC. *S. suis* cell wall inducing activity could also be due to other components, such as peptidoglycan (39). Moreover, the higher stimulatory capacity of the unencapsulated mutant B218 used in this study could also be caused in part by suilysin since it was shown to release more suilysin than its wild-type strain 31533 (D. Grenier, unpublished information).

In this regard, in addition to bacterial cell wall components, several thiol-activated, cholesterol-binding cytolytins, such as listeriolysin, pneumolysin, and streptolysin O, are also recognized to stimulate inflammatory response (12, 30, 38). Suilysin from *S. suis* has been shown to be cytotoxic for many different cell types, but only at very high bacterial concentrations (9, 53) and it was shown to interfere with the ability of neutrophils to kill *S. suis* (7). However, a certain inflammatory role of this toxin has also been suggested. For example, Jobin *et al.* (27) reported that suilysin was involved in the release of arachidonic acid, a prostaglandin precursor, from the membrane of human BMEC. Suilysin was also shown to stimulate TNF- α by human monocytes and IL-6 by swine pulmonary alveolar macrophages and monocytes (34). According to the results obtained in this study with non-hemolytic mutant SX911, purified suilysin, cholesterol, and different suilysin-positive or negative *S. suis* strains, it was clearly demonstrated that the toxin suilysin is the major factor responsible for IL-8 and IL-6 response by PBMEC stimulated with encapsulated strains of *S. suis*. This in contrast with our previous studies using swine whole blood cells (47) and human BMEC (52) that showed that although suilysin does stimulate cells, it only played a limited role in the inflammatory response to *S. suis*. To the best of our knowledge, this is the first report showing the suilysin as a key player in inflammation of swine BBB. Thus, suilysin has multiple effects toward endothelial cells from BBB and other cells involved in innate immunity, that could help *S. suis* to reach the CNS.

Since the cells used in this study did not produce IL-1 β and TNF- α with the positive control used, no conclusion on a possible induction of any of these cytokines by *S. suis* could be made. Interestingly, similar negative results were

obtained with human BMEC (52) and in an *in vivo* study using brain coronal sections of *S. suis*-infected mice that showed a lack of positive transcription signal for TNF- α and IL-1 β in microvascular vessels by *in situ* hybridization (16).

Interestingly, an unexpected pattern of IL-8 production was observed with bell-shaped IL-8 levels according to bacterial concentration used to stimulate the cells and ascending or descending IL-8 detectable levels according to incubation time and the strain used. Decreasing patterns of IL-8 levels were easily observed with several of the suilysin-producing strains and with some suilysin-negative strains, but to a lower extent. Results obtained using a reporter system and specific inhibitors suggest that decrease of IL-8 level was caused by IL-8 degradation by a serine protease activity present in *S. suis* growth supernatant. As virulence factors, bacterial proteases are involved in several functions, such as iron acquisition (6), immunoglobulin (13) and complement factor degradation (10), and tissue destruction (29). Recently, production of several proteases by *S. suis* such as Arg-aminopeptidase, chymotrypsin-like activity and caseinase activities, and a dipeptidyl peptidase IV, has been reported (28). To the best of our knowledge, this is the first study reporting the presence of a chemokine-degrading protease in *S. suis*. Recently, *Streptococcus pyogenes* (GAS) was shown to produce ScpC (also known as SpyCEP), a CXC chemokine protease (18, 23) that was different from the C5a peptidase (ScpA) and the broad-spectrum cysteine protease SpeB produced by GAS (23). ScpC was shown to impair PMN recruitment and was essential for virulence in mouse (24).

Confirming this hypothesis, disappearance of ~9 kDa porcine IL-8 was observed using SDS-PAGE consistently with previous studies with GAS ScpC which reported disappearance of ~8 kDa human IL-8 (18, 24). ScpC cleaves the CXC human chemokine IL-8 and the functional murine homologs KC and MIP-2 (24). LPS-induced CXC chemokine (LIX) is also degraded but to a lesser extent, while the CC chemokine RANTES is not degraded (24). Our results showed degradation of swine CXC chemokine IL-8, but not swine pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6. However, other chemokines need to be tested to confirm the CXC-specificity of *S. suis* serine protease activity. Sequence comparison between ScpC gene from GAS and complete *S. suis* genomes was also performed using available sequence data for European strain P1/7 produced by the *S. suis* Sequencing Group at the Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_suis), for North American strain 89-1591 produced by the Joint Genome Institute Microbial Genomics (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=strsu&advanced=1>), and for two Chinese isolates 98HAH33 and 05ZYH33 produced by the Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences (available through GenBank). A ScpC homologous gene was found in each available complete *S. suis* genome (unpublished information). Moreover, decreasing levels of IL-8 in PBMEC supernatants were also detected using European suilysin-positive strain P1/7 (unpublished data). However, some strains did not induce decreasing pattern of IL-8 levels. It is not known if a ScpC homolog gene coding for a functional protease is present in these strains or if the IL-8 degrading activity of these strains is strong enough to cause a detectable decrease in IL-8 levels. Even though, neutrophils infiltration were reported in brains from pigs suffering from *S. suis*-caused

meningitis (11, 43), we hypothesized that a *S. suis* IL-8 degrading activity could modulate the inflammatory process and delay PMN income to the site of inflammation, here the BBB. Studies are undergoing in our laboratory to further characterize this protease and its actual role in *S. suis* pathogenesis.

Taken together, our results suggest that *S. suis* serotype 2 are able to induce, at first, the production of IL-6 and IL-8 from PBMEC, that may cause an important recruitment of leukocytes and subsequent BBB breakdown facilitating the pathogenesis of *S. suis* induced meningitis. In a second time, *S. suis* could modulate this response by degrading IL-8 and consequently delaying recruitment of neutrophils to the site of inflammation, allowing this pathogen to survive and to cause meningitis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada grant No. 0680154280. G.V. is a recipient of a Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies scholarship and a Centre de Recherche en Infectiologie Porcine award.

REFERENCES

1. **Akira, S., T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* **4**:2860-2867.
2. **Al-Numani, D., M. Segura, M. Dore, and M. Gottschalk.** 2003. Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol* **133**:67-77.

3. **Baums, C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand.** 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **74**:6154-62.
4. **Berthelot-Herault, F., M. Gottschalk, H. Morvan, and M. Kobisch.** 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Can J Vet Res* **69**:236-240.
5. **Brassard, J., M. Gottschalk, and S. Quessy.** 2004. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* **102**:87-94.
6. **Brochu, V., D. Grenier, K. Nakayama, and D. Mayrand.** 2001. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral Microbiol Immunol* **16**:79-87.
7. **Chabot-Roy, G., P. Willson, M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* **41**:21-32.
8. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2):325-32.
9. **Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**:637-43.
10. **Cleary, P. P., U. Prahbu, J. B. Dale, D. E. Wexler, and J. Handley.** 1992. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infect Immun* **60**:5219-5223.
11. **Clifton-Hadley, F. A.** 1983. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J* **139**:1-5.
12. **Cockeran, R., C. Durandt, C. Feldman, T. J. Mitchell, and R. Anderson.** 2002. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect Dis* **186**:562-5.
13. **Collin, M., and A. Olsén.** 2001. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect Immun* **69**:7187-7189.
14. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **70**:1319-25.
15. **del Campo Sepulveda, E. M., E. Altman, M. Kobisch, S. D'Allaire, and M. Gottschalk.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-25.
16. **Dominguez-Punaro, M. C., M. Segura, M. M. Plante, S. Lacouture, S. Rivest, and M. Gottschalk.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-54.

17. **Draing, C., S. Sigel, S. Deininger, S. Traub, R. Munke, C. Mayer, L. Hareng, T. Hartung, S. von Aulock, and C. Hermann.** 2008. Cytokine induction by Gram-positive bacteria. *Immunobiology* **213**:285-96.
18. **Edwards, R. J., G. W. Taylor, M. Ferguson, S. Murray, N. Rendell, A. Wrigley, Z. Bai, J. Boyle, S. J. Finney, A. Jones, H. H. Russell, C. Turner, J. Cohen, L. Faulkner, and S. Sriskandan.** 2005. Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* **192**:783-90.
19. **Gottschalk, M., R. Higgins, and S. Quessy.** 1999. Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *J Clin Microbiol* **37**:4202-3.
20. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-72.
21. **Gottschalk, M., M. Segura, and J. Xu.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews* **8**:1-17.
22. **Gottschalk, M. G., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141** (Pt 1):189-95.
23. **Hidalgo-Grass, C., M. Dan-Goor, A. Maly, Y. Eran, L. A. Kwinn, V. Nizet, M. Ravins, J. Jaffe, A. Peyser, A. E. Moses, and E. Hanski.** 2004. Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections. *Lancet* **363**:696-703.
24. **Hidalgo-Grass, C., I. Mishalian, M. Dan-Goor, I. Belotserkovsky, Y. Eran, V. Nizet, A. Peled, and E. Hanski.** 2006. A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *Embo J* **25**:4628-37.
25. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 2005. Streptococcal Diseases, p. 769-783. *In* B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University, Ames, Iowa.
26. **Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg, and P. K. Storm.** 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **62**:1742-1748.
27. **Jobin, M. C., J. Fortin, P. J. Willson, M. Gottschalk, and D. Grenier.** 2005. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microb Lett* **252**:105-111.
28. **Jobin, M. C., and D. Grenier.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**:113-9.
29. **Juarez, Z. E., and M. W. Stinson.** 1999. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *Infect Immun* **67**:271-8.
30. **Kayal, S., A. Lilienbaum, C. Poyart, S. Memet, A. Israel, and P. Berche.** 1999. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**:1709-22.

31. **Kilpper-Bälz, R., and K. H. Schleifer.** 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **37**:160-2.
32. **Kobisch, M., M. Gottschalk, P. Morvan, R. Cariolet, G. Bénévent, and J. P. Joly.** 1995. Experimental infection of SPF piglets with *Streptococcus suis* serotype 2. *J. Rech. Porcine Fr.* **27**:97-102.
33. **Leib, S. L., and M. G. Tauber.** 1999. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* **13**:527-48, v-vi.
34. **Lun, S., J. Perez-Casal, W. Connor, and P. J. Willson.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* **34**:27-37.
35. **Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu.** 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* **7**:201-9.
36. **Madsen, L. W., B. Svensmark, K. Elvestad, B. Aalbaek, and H. E. Jensen.** 2002. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J Comp Pathol* **126**:57-65.
37. **Mai, N. T., N. T. Hoa, T. V. Nga, L. D. Linh, T. T. Chau, D. X. Sinh, N. H. Phu, L. V. Chuong, T. S. Diep, J. Campbell, H. D. Nghia, T. N. Minh, N. V. Chau, M. D. de Jong, N. T. Chinh, T. T. Hien, J. Farrar, and C. Schultsz.** 2008. *Streptococcus suis* Meningitis in Adults in Vietnam. *Clin Infect Dis*.
38. **Mitsui, K., K. Takano, S. Nakatani, H. Nambu, F. Shibata, and H. Nakagawa.** 2002. Chemokine production by rat macrophages stimulated with streptolysin O from *Streptococcus pyogenes*. *Microbiol Immunol* **46**:37-45.
39. **Moreillon, P., and P. A. Majcherczyk.** 2003. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* **35**:632-41.
40. **Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima.** 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine and Growth Factor Rev* **9**:9-23.
41. **Palmer, M.** 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* **39**:1681-9.
42. **Reams, R. Y., L. T. Glickman, D. D. Harrington, H. L. Thacker, and T. L. Bowersock.** 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet Diagn Invest* **6**:326-34.
43. **Sanford, S.** 1987. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. *Can. J. Vet. Res.* **51**:486-489.
44. **Segura, M., and M. Gottschalk.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* **70**:4312-22.
45. **Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-54.

46. **Segura, M., N. Vadeboncoeur, and M. Gottschalk.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**:243-54.
47. **Segura, M., G. Vanier, D. Al-Numani, S. Lacouture, M. Olivier, and M. Gottschalk.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:92-106.
48. **Standiford, T. J., D. A. Arenberg, J. M. Danforth, S. L. Kunkel, G. M. VanOtteren, and R. M. Strieter.** 1994. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun* **62**:119-25.
49. **Teifel, M., and P. Friedl.** 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res* **228**:50-7.
50. **Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggelnöhler, D. Matalon, A. Seibt, G. E. Novotny, H. J. Galla, and H. Schrotten.** 2005. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:25-34.
51. **Ulloa, L., and K. J. Tracey.** 2005. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med* **11**:56-63.
52. **Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier, and M. Gottschalk.** 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**:49-58.
53. **Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-9.
54. **Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* **59**:3156-3162.
55. **Willenburg, K. S., D. E. Sentochnik, and R. N. Zadoks.** 2006. Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N Engl J Med* **354**:1325.
56. **Wong, G. G., and S. C. Clark.** 1988. Multiple actions of interleukin-6 within a cytokine network. *Immunol. Today* **9**:137-139.
57. **Ye, C., X. Zhu, H. Jing, H. Du, M. Segura, H. Zheng, B. Kan, L. Wang, X. Bai, Y. Zhou, Z. Cui, S. Zhang, D. Jin, N. Sun, X. Luo, J. Zhang, Z. Gong, X. Wang, L. Wang, H. Sun, Z. Li, Q. Sun, H. Liu, B. Dong, C. Ke, H. Yuan, H. Wang, K. Tian, Y. Wang, M. Gottschalk, and J. Xu.** 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:1203-8.

ARTICLE IV

Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins

Ghyslaine Vanier¹, Tsutomu Sekizaki^{2,3}, María de la Cruz Domínguez-Punaro¹,
Miriam Esgleas¹, Makoto Osaki², Daisuke Takamatsu², Mariela Segura⁴, and
Marcelo Gottschalk^{1,*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Qc, J2S 2M2, Canada¹. Research Team for Bacterial/Parasitic Diseases, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan². United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagito, Gifu, Gifu 501-1193, Japan³. Centre for the Study of Host Resistance, McGill University Health Centre Research Institute, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Qc, H3G 1A4, Canada⁴.

Veterinary Microbiology, 2008. 127 (3-4):417-24.

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé activement à la conception et au désign expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Streptococcus suis, a major pathogen of swine, is an emerging zoonotic agent which causes meningitis and septic shock. In this study, we investigated the ability of *S. suis* mutant strain (SRT Δ A) lacking the sortase A gene (*srtA*) to interact with host cells and extracellular matrix (ECM) proteins, as well as its virulence in a mouse infection model. We demonstrated that mutant SRT Δ A had reduced capacity to adhere to and invade porcine brain microvascular endothelial cells compared to the wild-type strain. In addition, mutant SRT Δ A also showed significantly less adherence to plasma fibronectin, cellular fibronectin and collagen type I. However, disruption of *srtA* had little effect on the virulence of *S. suis* in a mouse intraperitoneal model of infection. These results indicate that surface proteins anchored by sortase A are required for a normal level of bacterial binding. However, other factors may also be important for *S. suis* virulence and interaction with host tissues.

Keywords: *Streptococcus suis*; sortase A; porcine; endothelial cells; extracellular matrix proteins; LPXTG motif.

INTRODUCTION

Streptococcus suis serotype 2 is an important swine bacterial pathogen associated mainly with meningitis but also with other diseases such as endocarditis, arthritis, septicemia, and pneumonia (12). Among 35 described serotypes, *S. suis* serotype 2 is the serotype most frequently recovered from diseased animals (12). Recently, serotypes 32 and 34, unlike other serotypes, have been shown to be more related to *Streptococcus orisratti* (14). As a zoonotic agent, *S. suis* has been isolated from human cases of meningitis, endocarditis, and toxic shock-like syndrome (28, 30). A recent, unprecedented outbreak in China resulted in >200 human cases that were directly linked to a concurrent outbreak of *S. suis* infection in pigs. Of these human cases, 20% were fatal (30).

Our understanding of *S. suis* virulence factors remains limited. While a few factors have been shown to be critical for virulence, others are considered as putative although their precise role in *S. suis*-related pathogenesis has yet to be clearly defined (11). In addition, the multi-step pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* is poorly understood (11). Most bacterial infections are initiated when bacteria adhere to host tissues. Likewise, initial interactions between *S. suis* and host tissues are also thought to be important for infection. In particular, interactions between *S. suis* and porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC) from the blood-brain barrier (BBB), which separates the central nervous system (CNS) from the bloodstream (10, 16), are thought to comprise a key step in the pathogenesis of *S. suis*-induced meningitis (26).

The extracellular matrix (ECM) is a complex structural network beneath epithelial and endothelial cells and surrounding connective tissue cells (23). Recently, it has been established that *S. suis* binds to several immobilized serum and ECM proteins such as plasma and cellular fibronectins and collagen types I, III, and V. Moreover, the adhesin(s) responsible for these interactions are proteinaceous in nature (8). However, the mechanisms underlying interactions between these proteins and *S. suis* have not been elucidated. In other Gram positive bacteria, many cell surface proteins possessing a Leu-Pro-X-Thr-Gly

(LPXTG) motif have been reported to mediate bacterial interaction with host cells, namely ECM, and thus play an important role in virulence (19). These specific proteins are covalently anchored to the cell wall by sortase A (SrtA), a membrane-bound thiol transpeptidase enzyme (19, 20). Five sortases of *S. suis* have been described thus far: SrtA, SrtB, SrtC, SrtD and SrtE (21). Of the five sortases, SrtA (recently classified as a class A sortase) has been shown to play a critical role in anchoring LPXTG proteins to *S. suis* cell wall (7, 21).

It is not clear whether SrtA and LPXTG proteins of *S. suis* are important for virulence and initial interactions between bacteria and host cells. In this study, we investigated the effects of a disruption of *srtA* gene on the capacity of *S. suis* to interact with PBMEC and ECM components and subsequently be virulent in an experimental mouse model of infection.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *S. suis* serotype 2 reference strain NCTC 10234 and its mutant SRTΔA, with targeted disruption of *srtA* as generated by allelic exchange via double crossover (21), were used in this study. Bacteria were grown overnight onto sheep blood agar plates at 37 °C and isolated colonies were incubated in Todd-Hewitt broth (THB; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 8 h at 37 °C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 µl of a 10⁻³ dilution of these cultures in 30 ml of THB and incubating for 16 h at 37 °C with agitation. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3, and were appropriately diluted in cell culture medium before infection. An accurate determination of the number of colony forming unit per ml (CFU/ml) in the final suspension was made by plating onto THB agar using Autoplate® 4000 (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA). *S. suis* mutant SRTΔA was grown in the presence of 5 µg ml⁻¹ of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Both strains showed similar growth rates (data not shown).

Cell culture. The PBMEC/C1-2 cell line (25) was cultivated as previously described (26). Briefly, cells were grown in a 1:1 mixture of Iscove's modified

Dulbecco's medium and Ham's F-12 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 7.5% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum, penicillin-streptomycin (Invitrogen), sodium bicarbonate, L-glutamine, human transferrin (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), N-acetyl-cysteine, hypoxanthine, porcine heparin, human recombinant fibroblast growth factor-basic (Sigma-Aldrich), and β -mercaptoethanol (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Flasks (BD Falcon™; BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and 24-well tissue culture plates (Primaria, BD Falcon™) were precoated with 1% (w/v) type A gelatin from porcine skin (Sigma-Aldrich). Cells were maintained at 37 °C with 5% CO₂ in a humid atmosphere. For assays, PBMEC were trypsinized by adding a trypsin-EDTA solution (Invitrogen) and diluted in culture medium at 8×10^4 cells/ml. The cell suspension was distributed in tissue culture plates and incubated to confluence. Before the experiments, medium was removed from the plates and replaced by medium without antibiotics.

Adherence and invasion assays. For adhesion assay, bacteria were pelleted, washed twice with PBS, and resuspended at 10^6 CFU/ml in fresh cell culture medium without antibiotics as previously described (26, 27). Confluent cell monolayers were infected with 1 ml aliquots of bacterial suspension. Plates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min and incubated for 2 h at 37 °C with 5% CO₂. The monolayers were washed five times with PBS, and incubated with 200 μ l of 0.05% trypsin-0.03% EDTA for 10 min at 37 °C. After the addition of 800 μ l of ice-cold deionised water, cells were detached and disrupted by scrapping the bottom of the well. Serial dilutions of this cell lysate were plated onto THB agars to enumerate viable bacteria. An invasion assay to quantify intracellular bacteria was performed in a similar manner as the adhesion assay, with one exception. Following the initial infection period, cells were washed twice with PBS and incubated with 1 ml of cell culture medium containing 100 μ g/ml of gentamicin and 5 μ g/ml of penicillin G (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C with 5% CO₂ (26, 27). Levels of adhesion and invasion are expressed as the total number of CFU recovered per well.

Binding of *S. suis* to ECM proteins Bacteria grown to a late exponential-phase were washed three times in PBS, resuspended at a concentration of 10^8

CFU/ml in 0.2% (v/v) formaldehyde, and incubated overnight at 4 °C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as previously described (8) using microtiter plates (Maxisorp, Nunc, VWR, Mississauga, ON, Canada) that had been coated overnight at 4 °C with 100 µl of plasma fibronectin (1 to 10 µg/ml) (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA), cellular fibronectin (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich), or collagen type I (1 to 12.5 µg/ml) (BD Biosciences) in 0.1 M carbonate coating buffer (pH 9.6). Wells were washed three times with PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST, pH 7.3), and blocked with 200 µl of 3% (w/v) non-fat dry milk in PBST. After 1 h at 37 °C, wells were washed three times with PBST and formaldehyde-killed bacterial suspensions (100 µl) were added. Plates were incubated for 2 h at 37 °C and washed three times. A 100 µl volume of *S. suis* serotype 2-specific rabbit antiserum (13) (diluted 1/3000 in PBST) was then added to each well. Plates were incubated for 1 h at 37 °C and were washed three times. A volume of 100 µl of horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) (diluted 1/8000 in PBST) was added and plates were incubated for 1 h at 37 °C. After washing three times with PBST, 3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine (Zymed, Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions. Reactions were stopped by adding 25 µl of H₂SO₄ (1 N) and then read at 450 nm using a microplate reader (UVmax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Uncoated and casein-coated wells served as background and non-specific adhesion of *S. suis* to protein-coated control wells, respectively. In addition, controls were performed to ensure that *S. suis* serotype 2-specific rabbit antiserum recognized wild-type strain and SRTΔA equally.

Intraperitoneal mouse virulence model. A total of 40 female CD1 6-week-old mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA, 10 animals per group) were infected intraperitoneally with either 1 ml of *S. suis* strain NCTC 10234 or 1 ml of mutant SRTΔA (approximately 10⁸ CFU in PBS). The CD1 mouse model was recently shown to be an excellent model of *S. suis* infection causing septic shock and meningitis (6). Body weight changes (due to an excessive production of pro-inflammatory cytokines) were recorded daily post-infection (p.i.) (6). Survival and

development of clinical signs of meningitis were recorded over a 10-day period. In addition, bacterial numbers in blood and homogenized brain samples were determined by plating on sheep blood agar plates using Autoplate® 4000 at different timepoints p.i. Experiments involving mice were repeated twice (total number of 20 animals per group) and were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Animal Welfare Committee of the Université de Montréal.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm standard deviations (error bars). Data were analyzed by two-tailed, unpaired *t* test. Unless specified, all assays were repeated at least three times. Statistical analysis of the survival data was performed with the LogRank test. A *P* value of < 0.05 was accepted as the minimal level of significance.

RESULTS

***srtA* gene contributes to the interactions between *S. suis* and endothelial cells.** As shown in Fig. 1, adhesion and invasion levels of mutant SRTΔA were strongly reduced to $16 \pm 24\%$ and $17 \pm 12\%$, respectively, compared to those of the wild-type strain (considered as 100%) when 10^6 CFU ml⁻¹ bacterial suspensions were used. Similar results were obtained with different concentrations of bacteria (data not shown). The complemented mutant SRTΔA (21) showed adhesion and invasion values of $88 \pm 17\%$ ($P = 0.008$ compared to the mutant SRTΔA) and $47 \pm 4\%$ ($P = 0.004$ compared to the mutant SRTΔA), respectively. These results confirm that sortase A is at least partially involved in *S. suis*-specific adhesion to and invasion of endothelial cells.

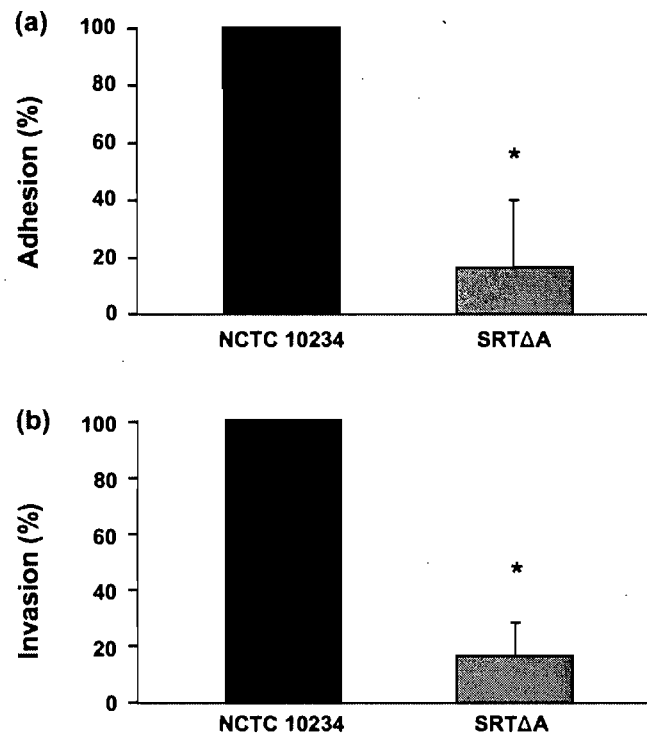


Fig. 1. (a) Adhesion to PBMEC by mutant SRTΔA compared to the wild-type strain NCTC 10234. (b) Invasion of PBMEC by mutant SRTΔA compared to the wild-type strain NCTC 10234. Adhesion and invasion are expressed as a percentage of the adhesion and invasion levels achieved by the wild-type strain NCTC 10234. Asterisk denotes values that are significantly different ($P < 0.05$) from those of NCTC 10234.

***srtA* gene contributes to adherence of *S. suis* to ECM proteins.** An ELISA binding assay was used to determine whether the mutant SRTΔA had altered capacity to bind plasma and cellular fibronectins and collagen type I. As shown in Fig. 2 (a), SRTΔA had reduced binding to plasma fibronectin by ($P < 0.05$) compared to the wild-type strain. A similar decrease in adhesion to cellular fibronectin was also observed (data not shown). Binding to collagen type I by mutant SRTΔA was also diminished ($P < 0.05$; Fig. 2 (b)). Adhesion to fibronectin and collagen type I by both strains was dependent on the protein concentration (Fig. 2).

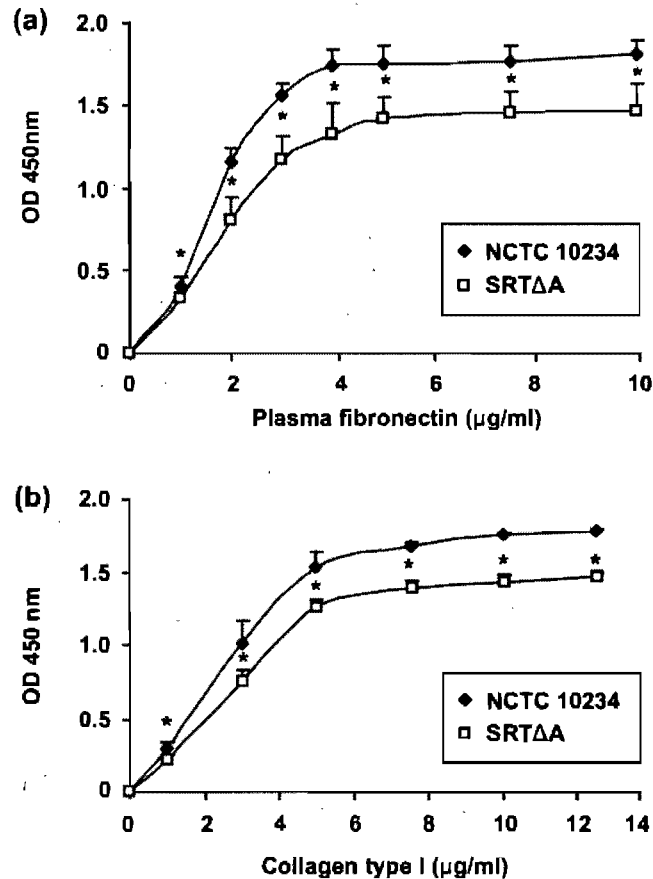


Fig. 2. Binding to different concentrations of plasma fibronectin (a) and collagen type I (b) by mutant SRTΔA compared to the wild-type strain NCTC 10234. Asterisk denotes values that are significantly different ($P < 0.05$) between the two strains.

Effect of *srtA* gene disruption on virulence. Animals from both groups showed only limited weight loss (0 to 10% of initial weight) between day (d) 0 and d 5, with maximum loss observed at d 2 p.i. (data not shown). In addition, weight gain from d 6 to the end of the experiment was not significantly different between groups ($P > 0.05$; data not shown). With respect to cumulative survival, CD1 mice infected with SRTΔA had slightly longer median survival (2 d), although this was not statistically significant ($P > 0.05$) compared to mice infected with the wild-type strain (1 d) (Fig. 3). Both strains displayed a similar mortality rate, with 80% of all animals dying within 10 d. Morbidity also did not differ between the groups; one mouse in each group developed clinical signs of meningitis (i.e. spatial disorientation). Blood and brain samples collected from infected animals during the

first 2 d p.i. showed no significant differences in bacterial load between the two groups (data not shown).

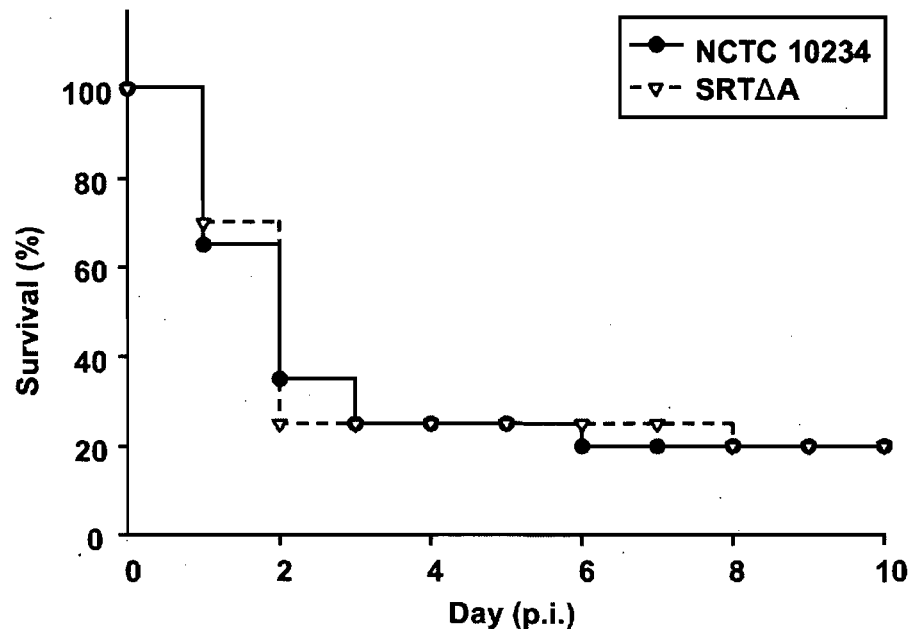


Fig. 3. Kaplan-Meier survival analysis of CD1 mice infected with the wild-type strain NCTC 10234 or the mutant SRTΔA ($P = 0.56$ for survival times between both groups). Six-week-old CD1 mice were inoculated i.p. with 10^8 bacteria, and survival was monitored over a 10-day period. Data are expressed as mean percentage of live animals in each group ($n=20$).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the mutant SRTΔA strain of *S. suis* has markedly impaired interactions with PBMEC *in vitro*. These findings provide evidence that sortase A of *S. suis* is involved in adhesion to and invasion of host cells and are consistent with those reported for other Gram-positive pathogens, such as *Streptococcus pneumoniae* (15), *Streptococcus sanguinis* (29), and *Streptococcus agalactiae* (17). Our results also showed mutant SRTΔA has reduced binding to ECM proteins, suggesting that SrtA of *S. suis* may anchor LPXTG-containing microbial surface components which recognize adhesive matrix molecules (MSCRAMM) that mediate binding to plasma and cellular fibronectins and to collagen type I. These findings are in agreement with previous studies on *S. agalactiae* (17) and *S. gordonii* (3), showing that SrtA-expressing strains bind in

significantly higher numbers to fibronectin compared to isogenic *srtA* mutant strains. Together these results suggest that LPXTG proteins anchored by SrtA are at least partially involved in the interactions between *S. suis* and host tissues.

Few LPXTG proteins of *S. suis* have been identified. Among these, the opacity factor of *S. suis* (OFS) and surface antigen one (Sao) have been recently described (1, 18). OFS is an opacity factor involved in virulence but not in colonization (1). Sao is an immunogenic protein that is expressed on the bacterial surface and confers protection to immunized animals (18). Moreover, surface expression of some LPXTG proteins is downregulated after disruption of the *srtA* gene (21). Indeed, mutant SRTΔA of *S. suis* has reduced expression of more than 15 major protein spots as visualized with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. From these protein spots, a previously described protein, the muramidase-released protein (MRP), as well as other newly described proteins similar to 5'-nucleotidase, and encoded by the genes *sntA*, *sntB*, and *sntC*, were identified. In European *S. suis* strains, MRP is considered to be a virulence marker (11). However, MRP alone is not necessary for virulence in swine and is absent in most North American virulent strains (12). Other putative *S. suis* LPXTG proteins and their role in virulence have yet to be identified. Moreover, the precise LPXTG protein(s) involved in *S. suis*-host interactions are unclear and warrant further investigation.

It should be noted that a deficiency of sortase A did not completely abolish interactions between *S. suis* and PBMEC or ECM proteins, suggesting that other factors may also contribute to *S. suis*-mediated pathogenesis. This is in agreement with our previous observations (27) demonstrating that non-proteinaceous cell wall components, such as lipoteichoic acid (LTA), are also involved in interactions between *S. suis* and PBMEC. Other pathogens, such as *S. pyogenes*, have been shown to possess multiple types of adhesins (LTA and proteins) that mediate interactions with host cells (4). Non-LPXTG proteins (non-MSCRAMM) might also be involved in binding to ECM proteins. Notably, *S. suis* possesses non-MSCRAMM ECM-binding proteins such as FBPS (5), a 52-kDa IgG-binding protein (24), and a recently described enolase (9). In a previous study, bacteria coated

with plasma fibronectin showed high levels of adhesion to and invasion of PBMEC, suggesting that *S. suis* uses plasma fibronectin as a bridge between bacteria and the host cell surface (27). Results obtained in the present study suggest that non-MSCRAMM as well as LPXTG-containing MSCRAMM ECM-binding proteins may be involved in these host-pathogen interactions.

Disruption of *srtA* gene had little effect on the virulence of *S. suis* in a mouse intraperitoneal model of infection. Our findings are consistent with those reported by Kharat and Tomasz (15) showing that a *srtA* mutant of *S. pneumoniae* was as virulent as the wild-type strain in mice. Paterson and Mitchell (22) demonstrated using a competitive infection model that *srtA* is a factor required for fitness rather than virulence of *S. pneumoniae*. It is not known whether a similar function can be attributed to *srtA* in *S. suis* infection. Indeed, there were no significant differences in levels of bacteremia between the wild-type and mutant strains. Survival of bacteria in blood is a critical step that enables the bacteria to disseminate throughout the host and ultimately gain access to the CNS. There is much evidence that the capsule is an important virulence factor that promotes bacterial resistance to phagocytic clearance (11). Recent results in our laboratory obtained using a coagglutination assay showed that the mutant SRTΔA is encapsulated (unpublished observation), which may explain its normal bacterial loads in blood. A high-grade bacteraemia was shown to be required for *S. suis* to subsequently reach the CNS, thus suggesting a critical role of the capsule for bacterial survival and dissemination in blood during *S. suis* invasion of the BBB (2).

Lastly, other class C sortases genes (*srtB*, *srtC*, *srtD* and *srtE*) (7) may also contribute to *S. suis*-host interactions. In *S. suis* NCTC 10234 strain, three class C sortases genes (*srtB*, *srtC*, *srtD*) cluster together and are associated with LPXTG proteins (21). It is possible that these accessory class C sortases, which are present in about 50% of virulent *S. suis* strains (T. Sekizaki, unpublished observations), might specifically anchor the flanking LPXTG-containing proteins. Studies are ongoing in our laboratory to verify the role of other *S. suis* sortases in bacterial interactions with host cells and proteins.

We conclude that *S. suis* SrtA anchors LPXTG-containing surface proteins, thus playing an important role in bacterial colonization of host cells and adhesion to ECM proteins. However, anchorage of LPXTG proteins alone is not sufficient for virulence in mice. Together, these observations suggest that although LPXTG-containing surface proteins participate in multiple steps of the pathogenesis of *S. suis* infection, other non-LPXTG proteins, including secreted, membrane-bound and non-proteinaceous components, are likely to be involved in cell colonization, ECM binding, and virulence.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.-P. Lecours for excellent technical assistance. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant No. 0680154280. G.V. and M.C.D.P. are recipients of a NSERC scholarship. M. S. is recipient of a Canadian Institutes of Health Research fellowship.

REFERENCES

1. **Baums, C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand.** 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **74**:6154-62.
2. **Berthelot-Herault, F., M. Gottschalk, A. Labbe, R. Cariolet, and M. Kobisch.** 2001. Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Vet Microbiol* **82**:69-80.
3. **Bolken, T. C., C. A. Franke, K. F. Jones, G. O. Zeller, C. H. Jones, E. K. Dutton, and D. E. Hruby.** 2001. Inactivation of the *srtA* Gene in *Streptococcus gordonii* Inhibits Cell Wall Anchoring of Surface Proteins and Decreases In Vitro and In Vivo Adhesion. *Infect Immun* **69**:75-80.
4. **Courtney, H. S., D. L. Hasty, and J. B. Dale.** 2002. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* **34**:77-87.
5. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **70**:1319-25.
6. **Dominguez-Punaro, M. C., M. Segura, M. M. Plante, S. Lacouture, S. Rivest, and M. Gottschalk.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-54.
7. **Dramsi, S., P. Trieu-Cuot, and H. Bierne.** 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **156**:289-97.
8. **Esgleas, M., S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* **244**:33-40.
9. **Esgleas, M., Y. Li, J. Harel, J. D. Dubreuil, and M. Gottschalk.** 2006. Presented at the Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, IL, USA.
10. **Goldstein, G. W., and A. L. Betz.** 1986. The blood-brain barrier. *Sci Am* **255**:74-83.
11. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-72.
12. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 2005. Streptococcal Diseases, p. 769-783. *In* B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University, Ames, Iowa.
13. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**:249-52.
14. **Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh.** 2005. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* **107**:63-9.

15. **Kharat, A. S., and A. Tomasz.** 2003. Inactivation of the *srtA* gene affects localization of surface proteins and decreases adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal cells in vitro. *Infect Immun* **71**:2758-65.
16. **Kniesel, U., and H. Wolburg.** 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **20**:57-76.
17. **Lalioui, L., E. Pellegrini, S. Dramsi, M. Baptista, N. Bourgeois, F. Doucet-Populaire, C. Rusniok, M. Zouine, P. Glaser, F. Kunst, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot.** 2005. The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect Immun* **73**:3342-50.
18. **Li, Y., M. Gottschalk, M. Esgleas, S. Lacouture, J. D. Dubreuil, P. Willson, and J. Harel.** 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* doi:10.1128/CVI.00046-07.
19. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:174-229.
20. **Novick, R. P.** 2000. Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. *Trends Microbiol* **8**:148-51.
21. **Osaki, M., D. Takamatsu, Y. Shimoji, and T. Sekizaki.** 2002. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **184**:971-82.
22. **Paterson, G. K., and T. J. Mitchell.** 2006. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes Infect* **8**:145-53.
23. **Preissner, K. T., and G. S. Chhatwal.** 2000. Extracellular Matrix and Host Cell Surfaces: Potential sites of Pathogen Interaction, p. 49-65. *In* P. Cossart, P. Boquet, S. Normark, and R. Rappuoli (ed.), *Cellular Microbiology*. ASM Press, Washington.
24. **Serhir, B., D. Dubreuil, R. Higgins, and M. Jacques.** 1995. Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *J Bacteriol* **177**:3830-6.
25. **Teifel, M., and P. Friedl.** 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res* **228**:50-7.
26. **Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-9.
27. **Vanier, G., M. Segura, and M. Gottschalk.** 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Can J Vet Res* **71**:81-89.
28. **Willenburg, K. S., D. E. Sentochnik, and R. N. Zadoks.** 2006. Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N Engl J Med* **354**:1325.
29. **Yamaguchi, M., Y. Terao, T. Ogawa, T. Takahashi, S. Hamada, and S. Kawabata.** 2006. Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect* **8**:2791-6.
30. **Ye, C., X. Zhu, H. Jing, H. Du, M. Segura, H. Zheng, B. Kan, L. Wang, X. Bai, Y. Zhou, Z. Cui, S. Zhang, D. Jin, N. Sun, X. Luo, J. Zhang, Z. Gong,**

X. Wang, L. Wang, H. Sun, Z. Li, Q. Sun, H. Liu, B. Dong, C. Ke, H. Yuan, H. Wang, K. Tian, Y. Wang, M. Gottschalk, and J. Xu. 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. Emerg Infect Dis 12:1203-8.

ARTICLE V

New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells

Ghyslaine Vanier^a, Josh D. Slater^b, María de la Cruz Domínguez-Punaro^a, Nahuel Fittipaldi^a, Andrew N. Rycroft^b, Mariela Segura^a, Duncan J. Maskell^c, Marcelo Gottschalk^{a,*}

^a*Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada*

^b*Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, University of London, North Mymms, Hatfield, Hertfordshire AL9 7TA, United Kingdom*

^c*Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ES, United Kingdom*

Microbial Pathogenesis, soumis, janvier 2008.

Rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai participé activement à la conception et au désign expérimental et à la mise au point des techniques. J'ai aussi effectué les manipulations et l'analyse des résultats. Finalement, j'ai fait la conception graphique et j'ai écrit le manuscrit.

ABSTRACT

Streptococcus suis serotype 2 is an important pathogen causing a wide range of infections in swine, the most important being meningitis. Few virulence factors have been identified and the pathogenesis of infection is not well understood. Recently, we demonstrated the ability of *S. suis* to adhere to and invade porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC) forming the blood-brain barrier. In this paper we describe the screening of a mutant library, produced by insertion of transposon Tn917 into the chromosome of *S. suis* strain P1/7, for mutants that are less able to interact with PBMEC. Both qualitative and quantitative screening assays were used to identify poorly invasive mutants. Tn917 insertion sites from nineteen poorly invasive mutants were sequenced and characterized. Five mutants were selected and their virulence was assessed in a mouse model of infection. Two out of these five mutants were attenuated as measured by decreased colonization of organs, as well as reduced mortality and morbidity. When tested in swine these two attenuated mutants led to decreased bacterial loads in blood, less severe and delayed clinical signs, and lower plasma IL-6 levels than did infection with the wild-type strain. Overall, our results suggest that these two genes which are homologous to genes coding for a protein containing a LPXTG motif and an ATPase component of an ABC transporter may contribute to the virulence of *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*; ABC transporter; Porcine endothelial cells; Mouse and pig models; Virulence

INTRODUCTION

Streptococcus suis serotype 2 is an important bacterial pathogen of swine associated mainly with meningitis, but also with other infections such as septicemia, endocarditis, arthritis, and pneumonia (20). Among the 35 serotypes described to date, *S. suis* serotype 2 is the one most frequently recovered from diseased animals (20). As an emerging zoonotic agent, *S. suis* has been isolated from an increasing number of human cases of meningitis, endocarditis, and toxic shock-like syndrome (47, 49). In 2005, an unprecedented outbreak in China resulted in >200 human cases that were directly linked to a concurrent outbreak of *S. suis* infection in pigs. Of these human cases, 20% were fatal (49).

Knowledge concerning virulence factors of *S. suis* is still limited. The capsular polysaccharide (CPS) is critical for virulence since isogenic mutants were markedly less virulent (4, 39). Several other virulence candidates, such as a hemolysin (sullysin) (16), an opacity factor (OFS) (1), a fibronectin- and fibrinogen-binding protein (FBPS) (7), adhesins (3), proteases (23), and other proteins, such as muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) (45), have also been proposed. Recently, a study using a signature-tagged mutagenesis system identified a variety of genes potentially involved in virulence of *S. suis*; among them, genes related to capsule biosynthesis and regulation of sullysin expression were identified (48).

The multi-step pathogenesis of meningitis caused by *S. suis* is poorly understood (14). Most bacterial infections, including those caused by *S. suis*, are initiated by the attachment of bacteria to host tissues. In particular, interactions of *S. suis* with porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC) from the blood-brain barrier (BBB), which separates the central nervous system (CNS) from the bloodstream (13, 24), are thought to be a key step in the pathogenesis of meningitis (14). We have recently shown that *S. suis* is able to adhere to and invade PBMEC (42) and that *S. suis* preferentially expressed particular genes upon interactions with PBMEC using selective capture of transcribed sequences (SCOTS) (10). These genes are involved in cell envelope modification, protein

sorting, proteolytic activity, regulation, cell division/regulation, transport/binding, and metabolism/housekeeping (10). The objective of this work was to find new putative virulence factors of *S. suis* by screening a Tn917-insertional mutant library for altered interactions with PBMEC.

RESULTS

Identification of genes involved in *S. suis* invasion of PBMEC. A qualitative screening assay, adapted from a previously used assay with group B *Streptococcus* (GBS) (34), successfully allowed the identification of poorly invasive *S. suis* mutants. More than 1000 Tn917 mutants were screened with PBMEC and 89 of these were qualitatively less invasive. Following a quantitative invasion assay with PBMEC, 19 of these mutants were confirmed to be significantly less invasive showing a reduction ranging from 97% to 70% ($P < 0.05$). Most of the other mutants also revealed a decreased invasion index, but to a lesser extent (between 20 and 65%, data not shown). Tn917 insertion sites from these 19 poorly invasive mutants were sequenced and characterized, and interrupted genes were identified (Table 1). These genes code for proteins which can be divided into the following seven groups: surface protein, transport/binding, regulatory functions, metabolism, amino acid synthesis, protein synthesis, and hypothetical proteins. Among them, a gene presenting homologies with a gene coding for a cell wall anchor domain of an unknown Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) putative surface protein (mutant B8A) was identified. In addition, genes homologous to genes coding for two proteins from the same putative ABC-type multidrug transport system were found (mutants F8D and H4F). Moreover, a gene downstream to the gene encoding sortase E, which was previously reported to be preferentially expressed by *S. suis* in contact with PBMEC (10), was also identified and is homologous to a gene coding for a putative mercuric resistant regulatory protein (mutant I10B). Also, a gene similar to a gene coding for a NUDIX hydrolase (mutant E5H) was also found. Interestingly, a member of the NUDIX hydrolase family was previously shown to be involved in invasion of human brain microvascular endothelial cells (hBMEC) by *E. coli* (2). To the best of our knowledge, none of these genes has been previously associated with the pathogenesis of *S. suis* infection.

Table 1: Genes identified from less invasive *S. suis* Tn917 insertion mutants with PBMEC

Mutant	Gene ^a	Putative function (Organism)	GenBank identification	Reference
<u>Surface protein</u>				
B8A	ssu1889	LPXTG-motif cell wall anchor domain (<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>cytotoxis</i> NVH 391-98)	YP_001376331	NA
<u>Transport/binding</u>				
F8D	ssu0835	ABC-type multidrug transport system, ATPase component (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89860	(5)
H4F	ssu0833	Putative bacteriocin operon protein (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89858	(5)
<u>Regulatory functions</u>				
B9B	ssu0828	Response regulator consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain (<i>S. suis</i> 98HAH33)	ABP92047	(5)
G7E	ssu1005	Regulatory protein, GntR (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875100	NA
I10B	ssu0455	Putative mercuric resistant regulatory protein <i>merR</i> (<i>S. suis</i>)	BAB83973	(35)
<u>Metabolism</u>				
B1A	ssu0199	Phosphotransferase system cellobiose-specific component IIC (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89180	(5)
B2D and C3A	ssu0890	Aldose 1-epimerase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00874440	NA
D12D	ssu1175	Lactoylglutathione lyase and related lyases (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP90309	(5)
E5H	ssu0990	NUDIX hydrolase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875084	(2)
H3H	ssu0797	Short-chain alcohol dehydrogenase (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89821	(5)
<u>Amino acid synthesis</u>				
E12F	ssu0838	Carbamoylphosphate synthase large subunit (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89862	(5)
J7E	ssu1611	Aspartokinase (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP90777	(5)
H3F	ssu0411	Shikimate kinase (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89424	(5)
<u>Protein synthesis</u>				
E7A	ssu0470	Lysyl-tRNA synthetase, class-II (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	ABP89485	(5)
<u>Hypothetical proteins</u>				
A8E and E12D	ssu0906	Hypothetical protein (<i>S. suis</i> 05ZYH33)	YP_001198415	(5)
J2F	ssu0823	Hypothetical protein (<i>S. suis</i> 98HAH33)	YP_001200441	(5)

^a Genes are named in accordance with the *S. suis* strain P1/7 sequencing project nomenclature.

NA: not available

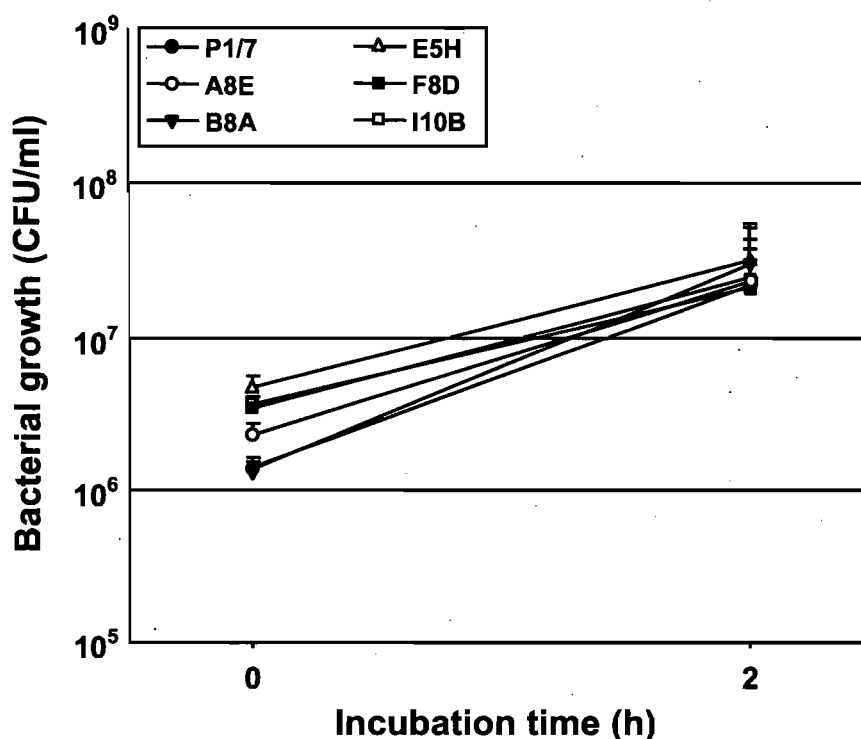


Figure 1. Bacterial growth of the wild-type strain P1/7 and 5 Tn917 insertion mutants during the 2 h PBMEC invasion period expressed as CFU/ml.

Virulence in mice. Five *S. suis* Tn917 insertion mutants (A8E, B8A, E5H, F8D, I10B) were selected for further study on the basis of several considerations including reduced PBMEC invasion (mutants A8E, B8A, E5H, F8D, I10B) with similar bacterial growth to the wild-type strain during the invasion assay (Figure 1, $P > 0.05$), previous association in the literature of similar genetic regions or genes with interactions with BMEC (mutants B8A, E5H, I10B) or biofilm formation (mutant F8D), or because two of the less invasive Tn917 insertion mutants were interrupted in the same gene (mutant A8E). The virulence of the five selected mutants was assessed in a CD1 mouse model of infection. Median cumulative survival times from groups of CD1 mice infected with different mutant strains were markedly different from that for the wild-type strain P1/7: As shown in Fig. 2, compared to mice infected with the wild-type strain which gave a median survival time of 6 days, mice infected with some mutants gave similar (A8E, 5 days) or even lower (I10B and E5H, 1 day) survival times. In contrast, animals infected with mutants B8A and F8D gave markedly improved median survival times of 10 days. Moreover,

mortality after 10 days was significantly lower in these two groups, compared to the wild-type infected mice ($P < 0.05$) (Table 2). Notably, zero mortality was recorded in mice infected with mutant F8D. For all groups, mice showing severe clinical signs were sacrificed for welfare reasons.

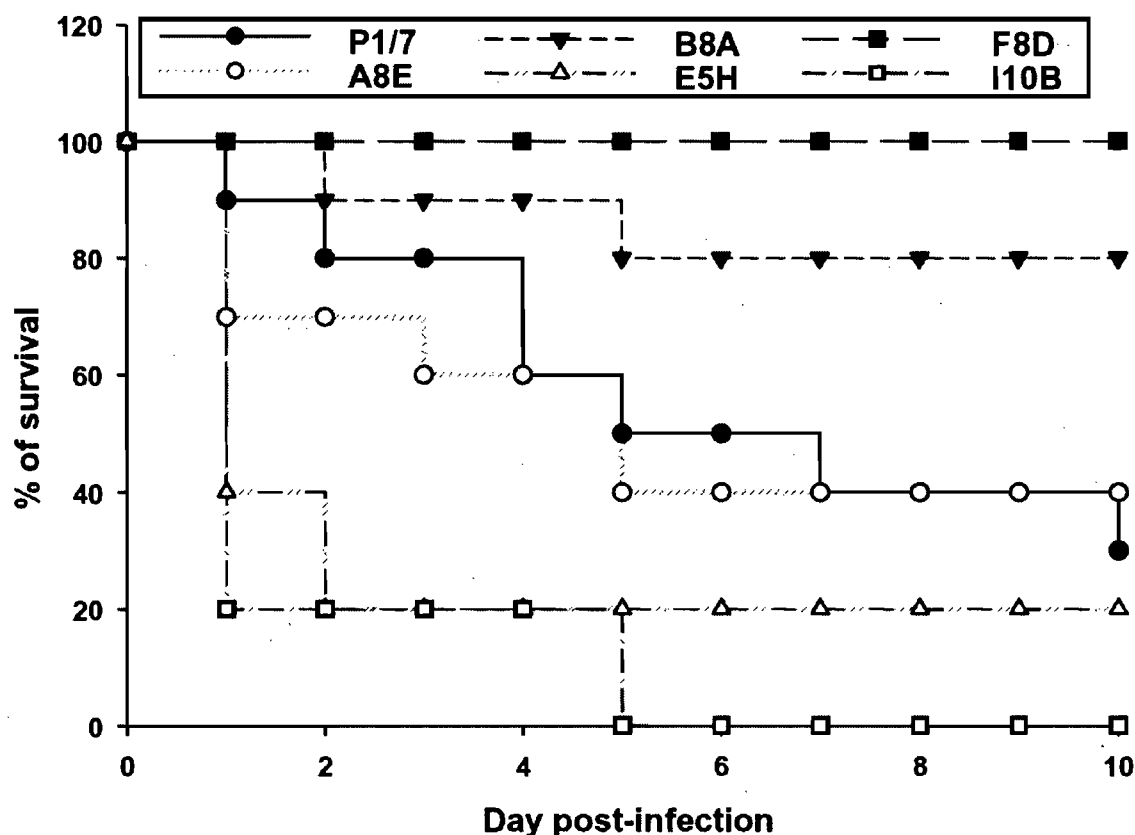


Figure 2. Survival curves for CD1 mice infected with the wild-type strain P1/7 and 5 Tn917 insertion mutants. Six-week-old CD1 mice were inoculated i.p. with 2×10^7 bacteria, and mice survival was monitored over a 10-day period. Data are expressed as mean percentage of live animals in each group ($n=10$).

Surviving animals from all groups showed variations in body weight. Animals from the group infected with wild-type P1/7 showed maximal mean weight loss of 15% on day 2, and recovered their initial body weight by day 7 p.i.. Animals from the group infected with I10B showed a constant decrease in body weight which correlated with the high mortality observed in this group. Animals from the groups infected by A8E and E5H showed maximal mean weight losses of 11% and 10% on days 2 and day 3 p.i., respectively ($P > 0.05$ vs P1/7 group), and recovery to normal body weight was delayed in animals infected with each of these mutants. In

contrast, at day 2 p.i., animals infected with B8A showed less severe loss of body weight than animals infected with P1/7 wild-type (9% vs. 15%, $P < 0.05$). Similarly, animals infected with F8D showed only a 5% loss of body weight compared to 14% observed in those infected with wild-type P1/7 at day 3 p.i. ($P < 0.05$). Finally, mice infected with either B8A or F8D recovered their initial body weights by day 6 p.i., and showed a weight gain of 6% and 3% at day 10 p.i, respectively.

The percentages of morbidity and mortality, as well as the clinical index, were different among groups of mice infected with the mutant strains (Table 2). Mice infected with I10B or E5H showed severe clinical signs of disease, severe lethargy and sudden death. These findings explain the high levels of mortality observed in mice infected with these two mutants. On the other hand, overall morbidity and mortality in animals infected with A8E were similar to those infected with the wild-type strain. In contrast, most of the mice infected with B8A showed only mild signs of infection such as swollen eyes and rough hair coat. This is in agreement with the low mortality compared to relatively high morbidity percentages observed in this group (Table 2). Notably, mice infected with F8D showed no mortality and only 20% of them showed mild clinical signs, such as rough hair coat.

Table 2: Virulence of *S. suis* wild-type strain P1/7 and five Tn917 insertion mutants in CD1 mice

	No. of mice	Morbidity ^a (%)	Clinical index ^b (%)	Mortality ^c (%)	No. of mice in which <i>S. suis</i> was isolated from:		
					blood	brain	liver
P1/7	10	100	16	70	8	9	8
F8D	10	20	0	0	1	2	1
B8A	10	90	3	20	4	4	2
A8E	10	70	24	60	7	8	7
E5H	10	80	36	80	8	8	8
I10B	10	100	41	100	10	10	10
negative	10	0	0	0	0	0	0

^aPercentage of mice with clinical symptoms.

^bPercentage of observations of severe symptoms i.e. meningitis, lumping, paddling, severe lethargy, sudden excitation followed by death.

^cPercentage of mice that died due to infection or were sacrificed for animal welfare reasons.

These measurements were performed over a period of 10 day post-infection.

S. suis were recovered from most organs from the majority of mice infected with P1/7, E5H, I10B and A8E between days 1 and 10 (Table 2). However, *S. suis* was detected in only a few mice infected with mutant B8A and F8D (Table 2). Interestingly, at the end of the experiment (day 10 p.i.), *S. suis* was recovered from 60% of surviving mice infected with wild-type P1/7, while it was recovered from only 40% of surviving mice infected with B8A and 20% of mice infected with F8D. These findings suggest a clear reduction in the invasive and/or within-host survival capacities of these two mutant strains.

Virulence in swine. Based on these results, two *S. suis* Tn917 insertion mutants, B8A and F8D, were selected for further evaluation in a pig model of infection. The percentage of morbidity of pigs infected with F8D was slightly lower compared to that observed in pigs infected with wild-type P1/7 strain and B8A (Figure 3A). In addition, at the end of the experiment (day 4), the percentage of surviving pigs was higher in the group infected with F8D (Figure 3A). All pigs infected with the wild-type P1/7 strain showed signs of infection such as lameness (9/10) and severe joint stiffness (1/10). Although animals infected with F8D or B8A showed lameness (7/10 and 9/10, respectively) and depression (2/10 and 7/10, respectively), presentation of these clinical signs was delayed compared to the earlier development of clinical signs in pigs infected with the wild-type strain. Furthermore, no significant body weight loss was observed in pigs infected with the mutant strains during the experimental period (data not shown). According to United Kingdom legislation, the presentation of these clinical signs was considered to be sufficient to require animal euthanasia. Hence, no clinical records could be performed after 4 days of infection for welfare reasons.

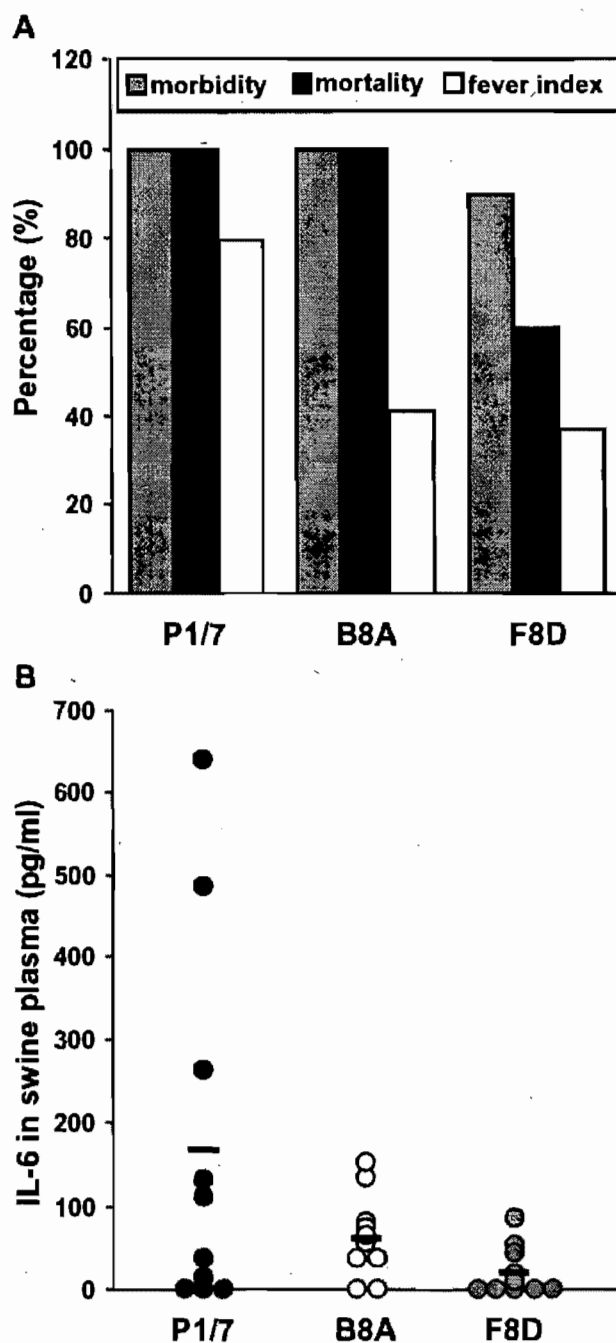


Figure 3. (A) Virulence of *S. suis* wild-type strain P1/7 and two Tn917 insertion mutants in pigs. Morbidity and mortality represent the percentage of pigs with clinical symptoms and the percentage of pigs that were sacrificed for animal welfare reasons, respectively. Fever index represents the percentage of observations for the experimental group of a body temperature $>40^{\circ}\text{C}$. (B) Levels of IL-6 in swine plasma from pigs infected with *S. suis* wild-type strain P1/7 and two Tn917 insertion mutants 24 h post-infection. Bars indicate mean IL-6 level for a group.

At the appearance of clinical signs, *S. suis* levels in blood were significantly different ($P < 0.05$) between groups, with $4.2 \pm 2.7 \times 10^3$, $1.1 \pm 1.8 \times 10^3$, and $0.6 \pm 0.7 \times 10^3$ CFU/ml of blood from pigs infected with P1/7, B8A and F8D, respectively. *S. suis* bacteria were recovered from most sampled organs from the majority of pigs irrespective of the infection group (data not shown). Unfortunately, no comparative quantitative analysis could be performed since animals were sampled at post-mortem examinations.

On the basis of previous observations with pig whole blood cells and in the mouse model of infection (8, 37), levels of pro-inflammatory cytokine IL-6, an endogenous pyrogen known as a marker for ongoing bacterial infections in pigs (11, 12), and the chemokine IL-8 were evaluated in plasma samples throughout the experiment. No differences were observed in IL-8 levels in plasma from pigs infected with wild-type strain P1/7 or either of the mutant strains (data not shown). On the other hand, markedly higher levels of pro-inflammatory IL-6 were observed (Figure 3B) in plasma from pigs infected with the P1/7 wild-type than from pigs infected with B8A or F8D, which is in agreement with the lower fever indices (11) shown by animals infected with these mutants (Figure 3A).

DISCUSSION

Despite its importance as a major swine pathogen and as an emerging life-threatening zoonotic agent, little is known about virulence factors of *S. suis* (14, 15). In our continued effort to understand the pathogenesis of *S. suis* infection, we used a qualitative invasion assay using PBMEC to screen a mutant library, followed by assessment of virulence levels of selected less invasive mutants in mouse and pig models of infection. Two mutants, B8A and F8D, were less invasive for PBMEC, attenuated in mice as evidenced by decreased colonization of organs, reduced mortality and morbidity and, to a lesser extent, also attenuated in pigs as indicated by decreased bacterial loads in blood, less severe and delayed clinical signs, and lower levels of the pyrogenic cytokine IL-6 in plasma.

In B8A, the Tn917 insertion site is located in a gene coding for a LPXTG-motif cell wall anchor domain from an unknown LPXTG protein (Table 1). Many

surface proteins possessing a LPXTG motif have been reported as mediating the interactions of Gram positive bacteria with host tissues, as they often confer the ability to bind to plasma components and host proteins from the extracellular matrix, and to adhere to and facilitate the invasion of host cells, thus playing important roles in virulence (33). In *S. suis*, a few important proteins that contain the LPXTG motif have been reported. These include OFS, an opacity factor involved in virulence though not in colonization (1), surface antigen one (Sao), an immunogenic protein of unknown function conferring protection on immunized animals (25, 26), and the virulence marker MRP (45). In B8A, the gene encoding the mutated LPXTG protein is followed by 4 other genes encoding proteins with LPXTG motifs, flanking a cluster of three class C sortase genes: *srtB*, *srtC* and *srtD* (9, 35). Interestingly, this region shows organizational similarity with the *rlrA* island from *Streptococcus pneumoniae* strain TIGR4 (18, 19). LPXTG proteins are covalently anchored to the cell wall by sortases (33). In *S. suis*, sortase A (a class A sortase) plays a critical role in anchoring LPXTG proteins to the cell wall (35). Moreover, we demonstrated recently that a mutant deficient for *srtA* had reduced capacity to adhere to and invade PBMEC and was less adherent to plasma fibronectin, cellular fibronectin and collagen type I compared to the wild-type strain (44). The identities of the proteins anchored by class C sortases in *S. suis* are not yet known as their role in virulence.

Pili were very recently described in Gram positive pathogens such as group A, group B *Streptococcus* (GAS, GBS) and *S. pneumoniae* (41). Although not completely elucidated, pilus assembly in GAS and GBS would occur through covalent polymerization by class C sortases of LPXTG pilin subunits encoded by genes within a pilus island (41). Moreover, pili are important for GBS adhesion to and invasion of hBMEC (27). In *S. suis*, Fittipaldi *et al.* (10) recently described a putative pilus island constituted by a signal peptidase which is followed downstream by the genes for a putative ancillary protein and a main pilus subunit and a previously undescribed class C sortase. Interestingly, expression of the signal peptidase gene from this island was upregulated in presence of PBMEC (10). This *S. suis* island presents similar genetic organization to GBS pilus island 2b (PI-2b), one of the three identified pilus islands in this species (41). Moreover, Jacques

et al. (22) reported the presence of thin and short pilus-like structures on the surface of *S. suis* using electron microscopy. Therefore, it is tempting to speculate on a second *S. suis* putative pilus island, similar to the *rlrA* island from *S. pneumoniae*, that has been interrupted in B8A and that this region would play a role in the invasion of endothelial cells from swine BBB and thus in virulence.

In F8D, the Tn917 insertion site was located in a gene coding for an ATPase component from an ABC-type multidrug transport system (Table 1) with homology to the BcrA subfamily of ABC transporters involved in bacitracin resistance (36). In bacteria, ABC transporters are important virulence factors because they play roles in secretion of toxins and antimicrobial agents and they are associated with many physiological processes (uptake of nutrients, non-classical secretion of signalling molecules, multidrug resistance) (6). Moreover, roles for genes from ABC transport systems in cell-to-surface and/or cell-to-cell interactions and biofilm development have been proposed for different organisms such as *Streptococcus gordonii*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Agrobacterium tumefaciens* (21, 28, 31). More specifically, in *Streptococcus mutans*, the *glrA* gene encoding for a bacitracin transport ATP-binding protein plays a role in biofilm formation (32). In *Burkholderia cepacia*, the multidrug-resistance efflux pump BcrA is an immunodominant antigen in cystic fibrosis patients (46). It is worth noting that *S. suis* form biofilms (17).

The genomic region interrupted by Tn917 in F8D seems to be required for *S. suis* interactions with host cells since a second mutant (H4F), in which Tn917 was inserted in the second gene located downstream of the gene mutated in F8D (Table 1), was also less invasive for PBMEC. In H4F, a gene coding for a putative bacteriocin operon protein (*ssu0833*) was interrupted. Interestingly, *S. suis* was previously shown to produce bacteriocin-like inhibitory substances (30). Both genes, *ssu0835* (mutant F8D) and *ssu0833* (mutant H4F) share sequence homologies with ABC-transporter forming genes from the GAS streptococcal A-FF22 lantibiotic regulon (29), where streptococcal A-FF22 is a bacteriocin. Overall, this genetic region seems to be important in *S. suis* interactions with host cells and virulence in *in vivo* models. Interestingly, a gene homologous to an ATP-binding protein from another multidrug ABC transporter was also reported to be

preferentially expressed by *S. suis* in contact with PBMEC (10). However, the actual function of the putative ABC transporter reported in the present study, as well as its substrate, remain to be determined.

The contribution to virulence of a hypothetical protein from mutant A8E was studied since two mutants (A8E and E12D, see Table 1) in which the gene coding for this protein was interrupted were less able to invade PBMEC. However, A8E showed no significant decrease in virulence in mice. In *E. coli* K1, a gene coding for a NUDIX hydrolase, *ygdP*, was associated with invasiveness of hBMEC (2). Although the NUDIX hydrolase identified in the present study (in mutant E5H) seems also to be involved in *S. suis* invasiveness of PBMEC *in vitro*, no reduction in virulence was observed in mice. Finally, *srtE* encoding a class C sortase was reported to be preferentially expressed by *S. suis* in contact with PBMEC (10). The transposon insertion in I10B was located in the *merR* gene located downstream of *srtE* (35). However, I10B showed no decrease of virulence in mice. Although this region seems to be involved in interactions between *S. suis* and PBMEC, its actual role in *S. suis* pathogenesis remains to be determined. Hence, a reduction in cell invasion level does not always correlate with a significant reduction in virulence *in vivo*. This lack of direct relationship for some mutants tested in this study could be explained by the fact that *in vivo* models of virulence are much more complex and involve different parameters.

In conclusion, the qualitative screening PBMEC invasion assay is a good first step model to find new putative virulence factor for *S. suis* since genes coding for a LPXTG protein and an ATPase component from an ABC transporter were identified as being involved in invasion of endothelial cells from the swine BBB and in *S. suis* virulence in mouse and pig models of infection in this study. Further studies focusing on the regions where these two genes are located are under way in our laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (38), isolated from a field case of meningitis, harbouring virulence markers MRP, EF, and suilysin, and from

which complete genome had been sequenced by the *S. suis* Sequencing Group at the Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_suis), was used as wild-type strain for this study. A mutant library was created using the pTV408 temperature-sensitive suicide vector to deliver Tn917 randomly into the chromosomal DNA of *S. suis* strain P1/7 via electroporation (38). *S. suis* Tn917 insertion mutants were grown in the presence of 1 µg/ml of erythromycin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and showed similar growth rate to wild-type strain P1/7 (data not shown).

PBMEC culture. The maintenance of the porcine brain microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 (40) was previously described (42, 43). A cell suspension of 8×10^4 cells/ml in culture medium was distributed in 24-well tissue culture plates (Primaria, BD Falcon™; BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) precoated with 1% (w/v) type A gelatin from porcine skin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and incubated to confluence. Before the experiments, medium was removed from plates and replaced by medium without antibiotics.

Qualitative screening invasion assay. A qualitative screening assay, previously described (34), and with some modifications, was adapted to *S. suis*. Briefly, *S. suis* bacteria were grown in Todd-Hewitt broth (THB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 8 h at 37 °C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 100 µl of a 10^{-1} dilution of these cultures in 5 ml of THB and incubating them for 16 h at 37 °C with agitation. Bacteria were washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.3) and 100 µl aliquots of bacterial suspension (approximately 1×10^8 CFU) were used to infect confluent cell monolayers from 24-well tissue culture plates containing 900 µl of cell culture medium (for an initial inoculum of 1×10^7 CFU/ml). Plates were centrifuged at 800 g for 10 min and incubated for 2 h at 37 °C with 5 % CO₂. The monolayers were washed twice with PBS, and incubated with 1 ml of cell culture medium containing 100 µg/ml of gentamicin and 5 µg/ml of penicillin G (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C with 5 % CO₂. Then, cells were washed three times with PBS, and incubated with 200 µl of 0.05% trypsin-0.03% EDTA for 10 min at 37 °C. Cells were detached and disrupted by scraping the bottom of the well and repeated pipetting. This cell lysate was left in the well and

mixed with 1 ml of THB containing a low concentration of agar (7.5 %, w/v) and incubated overnight at 37 °C. The number of *S. suis* colonies (representing intracellular invading *S. suis*) in the well were visually compared with the number of colonies obtained using the P1/7 wild-type strain (non-quantitative assay).

Quantitative invasion assay. The quantitative invasion assay was performed in essentially the same way as the qualitative invasion assay described above, but with some modifications. Bacteria were grown in THB for 8 h at 37 °C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 µl of a 10^{-3} dilution of these cultures into 30 ml of THB and incubating them for 16 h at 37 °C with agitation. Then, bacteria were pelleted, washed with PBS, and resuspended at approximately 10^6 CFU/ml in fresh cell culture medium without antibiotics as previously described (42, 43). An accurate determination of the number of colony forming units per ml (CFU/ml) in the final suspension was made by plating onto THB agar using Autoplate® 4000 (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA). Confluent cell monolayers were infected with 1 ml aliquots of bacterial suspension for 2 h, as described above. After incubation with 0.05% trypsin-0.03% EDTA for 10 min at 37 °C, 800 µl of ice-cold deionised water was added and the cells were scraped from the bottom of the well. Serial dilutions of this cell lysate were plated onto THB agar and incubated overnight at 37 °C for counts of viable bacteria. Total bacterial content of the well after the 2 h incubation period was also determined for the wild-type strain and selected mutants by plating bacteria from cell medium and lysate onto THB agar.

Plasmid rescue and sequencing of the insertion site. *Hind*III (Roche) digestions of chromosomal DNA were self-ligated using T4 DNA ligase (Quick Ligase kit from New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) and then transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue Supercompetent cells (Stratagene, La Jolla, CA) followed by selection of plasmids by plating onto Luria-Bertani (LB) agar plates containing ampicillin (100 µg/ml). Resultant colonies were picked and streaked out, and plasmid DNA was purified from liquid cultures using standard methods (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The plasmids, containing inserts of host chromosomal DNA flanking the transposon

insertion site, were sequenced using a 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the DNA Sequencing Facility of the University of Maine (Orono, ME). The primer tn917 seq (5'-AGAGAGATGTCACCGTCAAGT-3'), designed to read out from the transposon, was used for sequencing. *S. suis* DNA sequences flanking the Tn917 insertion sites. Sequences were analysed using the BLAST software package in the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequence comparison was also performed against data produced by the *S. suis* Sequencing Group at the Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_suis) for European strain P1/7 and by the Joint Genome Institute Microbial Genomics (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=strsu&advanced=1>) for North American strain 89/1591.

Mouse infection. A total of 70 female CD1 6-week-old mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA, 5 animals per group) were infected by intraperitoneal injection with 1 ml of either *S. suis* strain P1/7 or the Tn917 insertion mutants A8E, B8A, E5H, F8D, and I10B at approximately 2×10^7 CFU in THB. Mice infected with the vehicle solution (sterile THB) were used as controls (8). This CD1 mouse model is useful to study the early septic shock-like syndrome leading to death and, the second late phase of *S. suis* infection that induces evident brain damage (8). Body weight changes, clinical signs of infection (swollen eyes, rough hair coat, lethargy, and neurological signs) and survival were recorded daily post-infection (p.i.) over a 10-day (d) period as described (8). In addition, the presence of *S. suis* in blood (collected by cardiac puncture) and homogenized brain and liver samples was determined by plating on sheep blood agar plates using Autoplate[®] 4000 at different times post-infection. Experiments involving mice were repeated twice (10 animals per group) and were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Animal Welfare Committee of the Université de Montréal.

Inoculation of pigs. Thirty Large White four-week-old piglets (from a high health status herd) were randomly grouped into 3 different pens one week before

infection. Pigs were intravenously challenged via the ear vein with 1 ml of either *S. suis* strain P1/7, mutant B8A or mutant F8D at approximately 1×10^7 CFU in THB. Pigs were monitored daily p.i. for clinical signs of lameness, joint swelling, prostration, ataxia, recumbency, opisthotonus, paddling, and depression. Rectal temperature and body weight changes were also recorded. Results of rectal temperatures are expressed as fever index representing the percentage of observations for the experimental group of a body temperature $>40^\circ\text{C}$. The presence of *S. suis* in blood samples was monitored when clinical signs appeared, and in organs (brain, meninges, liver) at post-mortem examinations. Organs samples were homogenized with stainless steel beads (Qiagen), diluted in PBS and plated on Columbia agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) plates with oxolinic acid (5 $\mu\text{g/ml}$), colistin sulphate (10 $\mu\text{g/ml}$) and 5% (v/v) defibrinated horse blood. Pig experiments were conducted in the United Kingdom in accordance with the Animal Scientific Procedures Act 1986.

Determination of cytokine levels in plasma from experimentally infected pigs. Interleukin (IL)-6 and IL-8 were measured by ELISA using porcine-specific pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant porcine IL-6 (78 to 5000 pg/ml, R&D Systems) and IL-8 (18 to 1200 pg/ml, R&D Systems) were used to generate standard curves. Sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. Standard and sample dilutions were added in duplicate wells to each ELISA plate (Nunc, VWR, Ville Mont Royal, QC, Canada), and all analyses were performed at least three times for each plasma sample. Plates were read using a Molecular Devices UVmax (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA) microplate reader.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm standard deviations (error bars). Unless specified, data were analyzed by two-tailed, unpaired *t* test and all assays were repeated at least three times. Statistical analysis of the survival and body weight data were performed with the LogRank test and the Mann-

Whitney Rank Sum test, respectively. A *P* value of < 0.05 was considered as the threshold for significance.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.-P. Lecours, D. Meunier-Côté, C. A. Walker and M. Stubberfield for excellent technical assistance and Pr. T. Sekizaki (National Institute of Animal Health, Tsukuba, Ibaraki, Japan) for helpful discussions and advice. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP-FQRNT) grants to M. Gottschalk, and by a Wellcome Trust Research Leave Fellowship for Clinical Academics to J. Slater. During these studies, G. Vanier was a recipient of both Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) and NSERC scholarships. M.C. Domínguez-Punaro and N. Fittipaldi are recipients of NSERC scholarships.

REFERENCES

1. **Baums, C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand.** 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **74**:6154-62.
2. **Bessman, M. J., J. D. Walsh, C. A. Dunn, J. Swaminathan, J. E. Weldon, and J. Shen.** 2001. The gene *ygdP*, associated with the invasiveness of *Escherichia coli* K1, designates a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Ap5A). *J Biol Chem* **276**:37834-8.
3. **Brassard, J., M. Gottschalk, and S. Quessy.** 2004. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* **102**:87-94.
4. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2):325-32.
5. **Chen, C., J. Tang, W. Dong, C. Wang, Y. Feng, J. Wang, F. Zheng, X. Pan, D. Liu, M. Li, Y. Song, X. Zhu, H. Sun, T. Feng, Z. Guo, A. Ju, J. Ge, Y. Dong, W. Sun, Y. Jiang, J. Wang, J. Yan, H. Yang, X. Wang, G. F. Gao, R. Yang, J. Wang, and J. Yu.** 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE* **2**:e315.
6. **Davidson, A. L., and J. Chen.** 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:241-268.
7. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **70**:1319-25.
8. **Dominguez-Punaro, M. C., M. Segura, M. M. Plante, S. Lacouture, S. Rivest, and M. Gottschalk.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-54.
9. **Dramsi, S., P. Trieu-Cuot, and H. Bierge.** 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **156**:289-97.
10. **Fittipaldi, N., M. Gottschalk, G. Vanier, F. Daigle, and J. Harel.** 2007. Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. *Appl Environ Microbiol* **73**:4359-64.
11. **Fossum, C.** 1998. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domest Anim Endocrinol* **15**:439-44.
12. **Fossum, C., E. Watrang, L. Fuxler, K. T. Jensen, and P. Wallgren.** 1998. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6. *Vet Immunol Immunopathol* **64**:161-72.

13. **Goldstein, G. W., and A. L. Betz.** 1986. The blood-brain barrier. *Sci Am* **255**:74-83.
14. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-72.
15. **Gottschalk, M., M. Segura, and J. Xu.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews* **8**:1-17.
16. **Gottschalk, M. G., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141** (Pt 1):189-95.
17. **Grenier, D., L. Grignon, and M. Gottschalk.** 2007. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet J* doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.005.
18. **Hava, D. L., C. J. Hemsley, and A. Camilli.** 2003. Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae* *rlrA* pathogenicity islet by RlrA. *J Bacteriol* **185**:413-21.
19. **Hemsley, C., E. Joyce, D. L. Hava, A. Kawale, and A. Camilli.** 2003. MgrA, an orthologue of Mga, Acts as a transcriptional repressor of the genes within the *rlrA* pathogenicity islet in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**:6640-7.
20. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 2005. Streptococcal Diseases, p. 769-783. In B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University, Ames, Iowa.
21. **Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, and G. A. O'Toole.** 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* **49**:905-18.
22. **Jacques, M., M. Gottschalk, B. Foiry, and R. Higgins.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **172**:2833-8.
23. **Jobin, M. C., and D. Grenier.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**:113-9.
24. **Kniesel, U., and H. Wolburg.** 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **20**:57-76.
25. **Li, Y., M. Gottschalk, M. Esgleas, S. Lacouture, J. D. Dubreuil, P. Willson, and J. Harel.** 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* doi:10.1128/CVI.00046-07.
26. **Li, Y., G. Martinez, M. Gottschalk, S. Lacouture, P. Willson, J. D. Dubreuil, M. Jacques, and J. Harel.** 2006. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun* **74**:305-12.
27. **Maisey, H. C., M. Hensler, V. Nizet, and K. S. Doran.** 2007. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol* **189**:1464-7.

28. **Matthysse, A. G., H. A. Yarnall, and N. Young.** 1996. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **178**:5302-8.
29. **McLaughlin, R. E., J. J. Ferretti, and W. L. Hynes.** 1999. Nucleotide sequence of the streptococcin A-FF22 lantibiotic regulon: model for production of the lantibiotic SA-FF22 by strains of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **175**:171-7.
30. **Melancon, D., and D. Grenier.** 2003. Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Appl Environ Microbiol* **69**:4482-8.
31. **Mitrakul, K., C. Y. Loo, C. Gyurko, C. V. Hughes, and N. Ganeshkumar.** 2005. Mutational analysis of the *adcCBA* genes in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* **20**:122-7.
32. **Motegi, M., Y. Takagi, H. Yonezawa, N. Hanada, J. Terajima, H. Watanabe, and H. Senpuku.** 2006. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol* **72**:6277-87.
33. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:174-229.
34. **Nizet, V., A. L. Smith, P. M. Sullam, and C. E. Rubens.** 1998. A simple microtiter plate screening assay for bacterial invasion or adherence. *Methods in Cell Science* **20**:107-111.
35. **Osaki, M., D. Takamatsu, Y. Shimoji, and T. Sekizaki.** 2002. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **184**:971-82.
36. **Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, D. Zgur-Bertok, R. Komel, and M. Grabnar.** 1995. *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* **16**:969-76.
37. **Segura, M., G. Vanier, D. Al-Numani, S. Lacouture, M. Olivier, and M. Gottschalk.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:92-106.
38. **Slater, J. D., A. G. Allen, J. P. May, S. Bolitho, H. Lindsay, and D. J. Maskell.** 2003. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol* **93**:197-206.
39. **Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* **67**:1750-6.
40. **Teifel, M., and P. Friedl.** 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res* **228**:50-7.
41. **Telford, J. L., M. A. Barocchi, I. Margarit, R. Rappuoli, and G. Grandi.** 2006. Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**:509-19.

42. **Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-9.
43. **Vanier, G., M. Segura, and M. Gottschalk.** 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Can J Vet Res* **71**:81-89.
44. **Vanier, G., T. Sekizaki, M. C. Dominguez-Punaro, M. Esgleas, M. Osaki, D. Takamatsu, M. Segura, and M. Gottschalk.** 2007. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Vet Microbiol* *In press*.
45. **Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* **59**:3156-3162.
46. **Wigfield, S. M., G. P. Rigg, M. Kavari, A. K. Webb, R. C. Matthews, and J. P. Burnie.** 2002. Identification of an immunodominant drug efflux pump in *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother* **49**:619-24.
47. **Willenburg, K. S., D. E. Sentochnik, and R. N. Zadoks.** 2006. Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N Engl J Med* **354**:1325.
48. **Wilson, T. L., J. Jeffers, V. J. Rapp-Gabrielson, S. M. Martin, L. K. Klein, D. E. Lowery, and T. E. Fuller.** 2007. A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* doi:10.1016/j.vetmic.2006.12.025.
49. **Ye, C., X. Zhu, H. Jing, H. Du, M. Segura, H. Zheng, B. Kan, L. Wang, X. Bai, Y. Zhou, Z. Cui, S. Zhang, D. Jin, N. Sun, X. Luo, J. Zhang, Z. Gong, X. Wang, L. Wang, H. Sun, Z. Li, Q. Sun, H. Liu, B. Dong, C. Ke, H. Yuan, H. Wang, K. Tian, Y. Wang, M. Gottschalk, and J. Xu.** 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:1203-8.

IV. DISCUSSION

1) Étude et caractérisation de l'adhérence et l'invasion des cellules endothéliales porcines par *S. suis* sérotype 2

Les connaissances sur la pathogenèse de l'infection causée par *S. suis* demeurent limitées et plusieurs questions demeurent sans réponse. Un des points critiques concernant notre manque de connaissances face à cette pathogenèse est notre ignorance du(des) moyen(s) par le(s)quel(s) *S. suis* parvient à atteindre le SNC pour causer la méningite (135).

Malgré les informations partielles disponibles sur les interactions entre les BMEC humaines et *S. suis*, aucune donnée n'est disponible sur ces interactions avec les BMEC d'origine porcine. Bien que le porc soit l'hôte naturel et qu'on s'attendrait à ce que des études soient logiquement tout d'abord effectuées en utilisant des BMEC porcines, la non-disponibilité d'une telle lignée a ralenti la recherche sur cette question critique de la pathogenèse de la méningite à *S. suis* chez le porc.

Suite à son adhésion, S. suis envahit les PBMEC et y survit

Pour plusieurs pathogènes l'adhésion est la première étape menant à une infection. Nos résultats démontrent que *S. suis* adhère aux PBMEC et que cette adhésion augmente avec le temps (Article I). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des BMEC humaines (47).

Certains pathogènes bactériens causant la méningite, comme GBS (246), *E. coli* K1 (384), *S. pneumoniae* (281), *C. freundii* (19), et *L. monocytogenes* (372), peuvent traverser la BBB en tant que bactéries libres. Par contre, cette propriété n'a jamais été démontrée pour *S. suis* bien qu'il soit fréquemment isolé de cerveau de porcs malades présentant des signes cliniques de méningite (162, 221). Ainsi, les études précédentes ont démontré que même si la bactérie adhère aux BMEC humaines, elle n'y entre pas (47). Les résultats de la présente étude démontrent que suite à l'adhésion de *S. suis* à la surface des PBMEC, la bactérie entre à l'intérieur de celles-ci (Article I). Au meilleur de nos connaissances, il s'agit de la première étude rapportant l'invasion (l'entrée) de cellules endothéliales de la BBB

d'origine porcine par *S. suis*. Cette observation a un impact majeur pour la compréhension de la pathogenèse de la méningite causée par *S. suis*.

Ces interactions ont clairement été observées par microscopie électronique à balayage et à transmission (Article I). Ainsi, on observe des bactéries à l'intérieur d'invaginations et à l'intérieur de vacuoles liées à la membrane des PBMEC.

Des études au laboratoire utilisant les mêmes souches de *S. suis* avaient déjà démontré que la bactérie pouvait adhérer aux BMEC humaines et les activer, mais sans démontrer l'invasion de ces cellules (47, 351). Cette invasion spécifique des cellules porcines et non des cellules humaines pourrait s'expliquer par l'origine des cellules, d'ailleurs, le porc est l'hôte naturel de *S. suis*. Certains récepteurs sont peut-être suffisamment différents d'une espèce à l'autre ou la lignée de cellules BMEC humaines utilisée pourraient ne pas posséder de récepteurs spécifiques à *S. suis*.

Étant donné que *S. suis* entre à l'intérieur des PBMEC, il doit y survivre de façon temporaire pour pouvoir traverser la barrière formée par ces cellules et atteindre le SNC. Les résultats de la présente étude démontrent que *S. suis* survit en effet à l'intérieur des PBMEC pour un certain temps (jusqu'à 7 h après le traitement aux antibiotiques) (Article I), mais le nombre de bactéries survivantes diminue graduellement. Nous proposons l'hypothèse que cette baisse pourrait être causée en partie par la sortie des bactéries dans le milieu ambiant contenant des antibiotiques (bien que nous ne l'ayons pas prouvé). Par ailleurs, cette baisse n'est pas causée par une éventuelle entrée des antibiotiques à l'intérieur des cellules (données non publiées). Ce temps de survie serait suffisant pour permettre à la bactérie de ressortir de la cellule (causant ainsi une diminution du nombre de bactéries à l'intérieur de la cellule). En accord avec nos résultats, *S. pneumoniae* présente aussi une baisse graduelle *in vitro* du nombre de bactéries survivantes à l'intérieur des BMEC, similaire à celle de *S. suis*, tout en se retrouvant de l'autre côté de la monocouche de cellules dans un modèle de transwell (281). En fait, la plupart des pathogènes qui envahissent les cellules endothéliales le font de façon transitoire seulement (165).

Il serait intéressant d'utiliser un modèle de monocouche de cellules en Transwell pour confirmer nos données d'invasion. Un modèle en Transwell permettrait également de vérifier l'effet potentiel de *S. suis* sur les jonctions serrées (TJ) de la monocouche formée par les PBMEC en mesurant la résistance électrique transendothéliale (TEER). De plus, aucune information dans la littérature n'est disponible à propos des interactions entre les streptocoques pathogènes et les TJ ou leurs protéines ZO, occludines, claudines, cingulines, AF6 et 7H6. Certains pathogènes (parasites et virus) dégradent, induisent la redistribution ou même diminuent l'expression de ces protéines et endommagent les TJ pour traverser la BBB (126, 187, 219). Les interactions entre ces protéines et *S. suis* pourraient aussi être vérifiées par des études de microscopies électroniques confocales.

L'entrée de S. suis à l'intérieur de la cellule dépend d'une réorganisation de l'actine

L'entrée des bactéries à l'intérieur d'une cellule implique la réorganisation des filaments d'actine (97, 354). L'inhibition de l'invasion des PBMEC par *S. suis*, est dépendante de la dose utilisée d'inhibiteur de cette réorganisation (cytochalasine D), ce qui renforce donc nos résultats d'invasion (Article I). Les microtubules ne semblent pas être impliqués dans cette invasion puisque des doses élevées de colchicine n'ont eu aucun effet sur les niveaux d'invasion de la bactérie (Article I). Des résultats similaires ont été rapportés pour GBS et *S. pyogenes* (140).

La capsule interfère avec les interactions entre S. suis et les PBMEC

La CPS interfère avec l'adhésion et l'invasion des PBMEC puisqu'un mutant non capsulé a montré un niveau d'adhésion supérieur à la souche parentale capsulée (Article I). Évidemment, le niveau plus élevé d'invasion suite à une adhésion plus élevée peut en être une conséquence. L'interférence causée par les polysaccharides capsulaires pourrait être de nature stérique en empêchant les interactions entre les adhésines/invasines de *S. suis* avec les récepteurs à la surface des PBMEC. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été décrit pour

d'autres pathogènes avec des cellules endothéliales (ex. *S. pneumoniae* (281) et *H. influenzae* (360)). De plus, la capsule de *S. suis* a aussi interféré avec son adhésion aux cellules épithéliales porcines (204).

L'acide sialique, une composante majeure de la CPS de *S. suis* (104), n'inhibe pas le contact, ni l'invasion des PBMEC par *S. suis* (Article II) démontrant qu'il n'est pas impliqué de façon spécifique dans ces interactions. Nous proposons l'hypothèse que la CPS n'intervient pas dans ces interactions entre *S. suis* et les PBMEC mais les entrave en masquant d'autres molécules. Par ailleurs, l'acide sialique intervient bien dans les interactions entre *S. suis* et les macrophages (295) démontrant aussi que la bactérie n'utilise pas les mêmes adhésines pour adhérer à différents types cellulaires présents chez l'hôte.

Par contre, même si la CPS semble interférer avec la capacité de la bactérie à interagir avec les PBMEC, elle contribue à l'atteinte de la BBB par la bactérie. Ainsi, elle lui permet de survivre jusque là en résistant à la phagocytose par les cellules phagocytaires qu'elle rencontrera tout au long de son parcours (44, 296). D'ailleurs, une forte bactériémie semble être requise pour l'atteinte du SNC par *S. suis*, ce qui sous-entend que la survie et la dissémination de la bactérie dans le sang seraient dues à la présence de la CPS (31).

La paroi cellulaire et son LTA participent aux interactions entre S. suis et les PBMEC

Des adhésines/invasines sont présentes dans la paroi cellulaire de la bactérie (Article II). Bien que la capsule les masque partiellement, elles sont tout de même exposées à la surface bactérienne puisque les souches capsulées de *S. suis* sont capables d'interagir avec les PBMEC (Articles I et II). Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus avec la paroi cellulaire de *S. suis* et des cellules épithéliales porcines (204). Les composantes de la paroi cellulaire d'autres espèces bactériennes possédant une capsule, telles que *S. pneumoniae*, GAS et GBS sont également impliquées dans leur adhésion aux cellules hôtes (14, 23, 243).

Les résultats obtenus avec des BMEC humaines (47) sont différents de ceux que nous avons obtenus dans la présente étude. Ainsi, un mutant non-capsulé dont la paroi cellulaire est exposée n'a pas montré plus de capacité d'adhérer aux BMEC humaines comparativement à sa souche parentale capsulée, contrairement à ce qui a été observé avec les PBMEC (Article I). Ces résultats suggèrent que des ligands pour les interactions avec les BMEC humaines sont différents de ceux des BMEC porcines.

L'importance de la paroi cellulaire de *S. suis* pour ses interactions avec les PBMEC a également été corroborée par des résultats obtenus récemment, démontrant que le gène *pgdA*, codant pour une peptidoglycan N-acetylglucosamine déacétylase ayant la capacité de modifier la paroi cellulaire de la bactérie, est préférentiellement exprimé par *S. suis* lorsqu'il est en présence de PBMEC (113) (*en annexe de cette thèse*). De plus, un mutant $\Delta pgdA$ a démontré une virulence atténuée dans un modèle d'infection murin (114).

Le LTA, qui fait partie de la paroi cellulaire, semble aussi être impliqué dans ces interactions (Article II) puisqu'il a bloqué l'adhésion aux et l'invasion des cellules PBMEC. De plus, une étude de Fittipaldi *et al.* (113) (*en annexe de cette thèse*) a apporté un indice supplémentaire sur le rôle du LTA dans ces interactions en démontrant que l'expression de l'opéron *dlt* était augmentée suite au contact de *S. suis* avec des PBMEC. L'opéron *dlt* est impliqué dans la D-alanylation du LTA et joue un rôle important dans la virulence chez les GBS (268). L'inactivation du gène *dltA*, codant pour une « D-alanine : D-alanyl carrier protein ligase (AMP forming) (Dcl) » a diminué la capacité d'un mutant de *S. suis* à adhérer et à envahir des PBMEC (*en utilisant le modèle décrit dans cette thèse*), a augmenté la susceptibilité aux effets bactéricides des neutrophiles porcins et a réduit, mais pas complètement, la virulence de *S. suis* chez la souris (115).

Des protéines bactériennes sont impliquées dans l'adhésion et l'invasion des PBMEC

Certaines des composantes bactériennes impliquées dans l'adhésion et l'invasion des PBMEC sont de nature protéique (Article II). Ainsi, des traitements à

l'aide de différentes protéases (protéinase K, pronase et trypsine) ont inhibé l'adhésion et l'entrée de *S. suis* à l'intérieur des PBMEC. Ces composantes protéiques pourraient provenir de la paroi cellulaire bactérienne qui est impliquée dans ces interactions (Article II). D'après des études utilisant des concentrations similaires de ces mêmes protéases, des protéines sont également impliquées dans l'adhésion de *S. suis* à des érythrocytes (338), mais pas aux macrophages (295) ou à des cellules épithéliales porcines (204) démontrant ainsi que la bactérie utilise des adhésines spécifiques pour adhérer à différents types cellulaires présents chez l'hôte. Comme chez *H. influenzae* (360) et *Staphylococcus aureus* (306), la présence des protéines déjà existantes à la surface bactérienne serait suffisante à l'invasion des cellules puisque l'inactivation de la synthèse de nouvelles protéines n'affecte pas la capacité de la bactérie à entrer dans les PBMEC (Article I).

***S. suis* utilise des composantes du sérum pour interagir avec les PBMEC**

Nos résultats suggèrent que *S. suis* pourrait se servir de protéines sériques comme des ponts pour mieux interagir avec des cellules cibles, telles que les PBMEC. Ainsi, le niveau d'invasion des PBMEC est directement proportionnel à la concentration de sérum de porc présente (Article II). Par contre, les composantes du sérum de porc favorisant l'invasion ne semblent pas être absolument nécessaires à ce processus puisque l'absence de sérum ne signifie pas l'absence d'invasion. Par ailleurs, l'espèce d'origine du sérum semble être importante pour ce pontage puisque la concentration utilisée de FBS n'a eu aucune influence sur le niveau d'invasion. Une étude récente, utilisant du sérum de porc pour pré-traiter les bactéries, a donné des résultats similaires (25).

Récemment, Esgleas *et al.* (106) ont décrit que *S. suis* lie la fibronectine plasmatique et cellulaire et de Greeff *et al.* (76) ont aussi décrit une adhésine chez *S. suis* liant la fibronectine, la FBPS. Étant donné que la fibronectine est retrouvée en abondance dans le sang, elle serait facilement disponible pour les bactéries en circulation. Nos résultats démontrent que le recouvrement de la bactérie par la fibronectine plasmatique facilite grandement son adhésion et par la suite son invasion des PBMEC (Article II). Ainsi, la fibronectine pourrait participer (en partie)

à l'augmentation des interactions entre *S. suis* et les PBMEC en présence de sérum porcin. D'autres pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* (228), *S. pyogenes* (74) et *Enterococcus faecalis* (304) utilisent cette stratégie en liant la fibronectine en tant que pont ou directement sur les cellules. De plus, la liaison pourrait aussi aider la bactérie à éviter le système immunitaire et par le fait même à se propager au travers de l'organisme, comme c'est le cas pour *S. pyogenes* (84). Par contre, l'adhésine FBPS ne semble pas être impliquée dans cette augmentation des interactions entre *S. suis* et les PBMEC suite à l'addition de la fibronectine puisqu'un mutant déficient en FBPS n'a démontré aucune différence au niveau de ces interactions en comparaison avec sa souche parentale (Article II). Ceci suggère que *S. suis* possède d'autres protéines de surface liant la fibronectine. C'est d'ailleurs le cas d'autres streptocoques possédant plusieurs récepteurs pour la fibronectine (72). De plus, Esgleas *et al.* (107) ont récemment démontré que l' α -énolase de *S. suis* pouvait aussi lier la fibronectine.

La capacité d'adhérer et d'envahir les PBMEC est observée chez toutes les souches testées lors de nos études. Par contre, on observe effectivement des différences entre les souches, mais pas entre les groupes de souches. Ainsi, cette capacité n'est pas corrélée avec leur origine géographique, leur virulence, leur hôte d'origine, ni leur capacité à produire la suilysine (Article II).

Plus spécifiquement, le fait que l'hôte d'origine de la souche n'influence pas le degré d'interaction avec les PBMEC concorde avec des données qui avaient déjà été obtenues au laboratoire avec des BMEC humaines et des cellules épithéliales porcines (47, 204). D'ailleurs, le fait que *S. suis* soit un agent de zoonose suggère que des souches infectieuses du porc peuvent infecter l'humain. Les souches européennes ont des phénotypes et des génotypes distincts des souches nord-américaines (158), mais ceci ne semble pas suffisant pour causer des différences au niveau des interactions entre *S. suis* et les PBMEC. De plus, la plupart des souches européennes produisent de la suilysine (32). La suilysine ne contribue pas à l'adhésion ni à l'invasion des cellules (Articles I et II), au contraire de l'hémolysine de GBS (88). Encore ici, la distinction entre les souches virulentes et non-virulentes n'a pas d'effet significatif (Article II). Ces résultats pourraient être

expliqués par le fait que la virulence tout comme l'adhésion et l'invasion sont des processus multi-factoriels.

Collectivement, nos données démontrent que les interactions entre *S. suis* et les PBMEC mettent en jeu plusieurs adhésines/invasines et des composantes du sérum qui agissent en tant que molécules pontantes. Ces résultats ont été rapportés chez *E. coli* (384) et *S. pneumoniae* (72) qui possèdent différents types d'adhésines/invasines pour favoriser leurs interactions complexes avec les cellules de l'hôte. D'autres études seront nécessaires pour l'identification individuelle de ces adhésines/invasines et des molécules de pontages bien que le LTA et la fibronectine aient été identifiées dans cette étude (Article II).

***S. suis* interagit aussi avec des PBMEC primaires**

Tout au long de nos études, nous avons opté pour l'utilisation d'une lignée immortalisée de cellules PBMEC qui est une culture continue et reproductible à l'inverse d'une culture de cellules primaires qui peut s'avérer complexe et occasionner des différences entre les lots.

Dans le but de confirmer nos résultats obtenus avec des cellules immortalisées, nous les avons comparés avec ceux obtenus avec des cellules PBMEC primaires. Ainsi, l'adhésion/invasion de *S. suis* avec des PBMEC primaires ont bien lieu et dépendent de la concentration bactérienne (Article II) et le niveau de ces interactions est similaire à celui obtenu avec les PBMEC immortalisées. Ceci confirme que les résultats obtenus avec les PBMEC immortalisées ne sont pas dus à une quelconque modification causée par leur immortalisation.

***S. suis* interagit aussi avec des cellules endothéliales porcines périphériques**

Parallèlement à nos recherches avec des cellules endothéliales porcines de microvaisseaux cérébraux, nous avons mené des études complémentaires en utilisant des cellules endothéliales d'aorte de porc pour savoir si cette propriété d'interagir avec les cellules était exclusive aux PBMEC. Les larges vaisseaux sont

perméables et leurs cellules expriment des molécules d'adhésion et des récepteurs différents de ceux des cellules endothéliales des microvaisseaux (319, 343). Nos résultats démontrent que *S. suis* adhère aux et envahit les deux lignées à l'étude (les AOC et les PAEC₁₁) (Article II) de façon dépendante de la concentration bactérienne utilisée pour l'infection. Au meilleur de nos connaissances, il s'agit de la première étude rapportant l'invasion de cellules endothéliales périphériques d'origine porcine par *S. suis*. Ces résultats sont en accord avec une étude récente de Benga *et al.* (25), démontrant également que *S. suis* adhère à une lignée de cellules endothéliales d'aorte. Ces cellules posséderaient donc, tout comme les PBMEC, les récepteurs nécessaires à *S. suis*. Tout comme avec les PBMEC (Article I), la CPS interfère avec les capacités d'adhésion et d'invasion de ces deux lignées de cellules endothéliales d'aorte par la bactérie. Ces capacités lui sont conférées par les composantes de la paroi cellulaire. Cette propriété d'interagir avec différents endothéliums (de micro- et de macrovaisseaux) pourrait lui permettre de mieux se disséminer dans l'organisme.

À l'opposé, des études précédentes avec des cellules humaines avaient démontré que bien que *S. suis* adhère à des cellules humaines de microvaisseaux, les BMEC, il n'adhère pas, à toute fin pratique, à des cellules de vaisseaux périphériques, les HUVEC (47). Cette différence est probablement due à une absence de récepteurs nécessaires à l'interaction avec *S. suis*. Par contre, aucune autre donnée n'est disponible sur les interactions de *S. suis* avec une autre lignée endothéliale périphérique d'origine humaine. Les informations sont donc très fragmentaires.

L'identité des récepteurs ciblés par *S. suis* sur les cellules endothéliales porcines (principalement les PBMEC) n'a pas été étudiée au cours de nos recherches et reste à déterminer. Cependant, les résultats que nous avons obtenus nous laissent suggérer qu'il pourrait s'agir de récepteurs pour la fibronectine liée par *S. suis* (Article II) comme par exemple l'intégrine $\beta 1$ (175, 225). Par contre, étant donné que *S. suis* lie plusieurs autres protéines de la MEC (106), d'autres récepteurs pour ces protéines de la MEC pourraient être impliqués tel qu'il a été rapporté chez *S. pyogenes* (74). Des protéines possédant un motif LPXTG

ancrées par la sortase A pourraient également interagir directement avec des récepteurs de type intégrine $\beta 1$, comme les protéines SspA/B de *S. gordonii* (247). De plus, étant donné que l'adhésion/invasion a lieu même en l'absence de sérum (Article II), d'autres types de récepteurs pourraient être impliqués. Des études de purification par affinité aux composantes de *S. suis* pourraient permettre l'identification des récepteurs à la surface des PBMEC et par la suite servir à identifier les adhésines bactériennes spécifiques à ces récepteurs.

2) Conséquences des interactions entre *S. suis* et les cellules endothéliales porcines de la BBB

2.1) Effets cytotoxiques

La suilysine est toxique pour plusieurs types de cellules. Ainsi, de nombreuses études rapportent la toxicité de la suilysine envers des cellules endothéliales humaines, des cellules épithéliales porcines et des cellules phagocytaires humaines, murines et porcines (44, 47, 204, 295). Les résultats obtenus dans cette thèse sont donc en accord avec ces études précédentes. Ainsi, la suilysine est le principal facteur responsable de la toxicité de *S. suis* envers les PBMEC, tel que démontré par l'utilisation de suilysine purifiée, d'un mutant suilysine-négatif, de fortes doses de souches hémolytiques et de cholestérol liant cette toxine (Article I). La suilysine est également toxique pour les cellules endothéliales d'aorte porcines (Article II).

Par ailleurs, nous avons également démontré que la paroi cellulaire n'a pas d'effet toxique sur les PBMEC, suite à l'utilisation d'un mutant non-capsulé dont la paroi cellulaire était exposée (Article II). Ces observations sont similaires à celles obtenues avec la paroi de *S. pneumoniae* en contact avec des BMEC bovines (390).

Au niveau de la pathogenèse, le potentiel des souches produisant la suilysine d'endommager la BBB pourrait faciliter leur passage au travers de cette barrière. Bien que la suilysine ne soit pas le seul atout de la bactérie et qu'elle ne soit pas considérée comme un facteur de virulence classique, sa toxicité envers un

large éventail d'autres types cellulaires (neutrophiles (44), monocytes, macrophages (295), épithéliales (204)) rencontrés tout au long du périple de *S. suis* fait de la suilysine un outil fort utile à la progression de la bactérie.

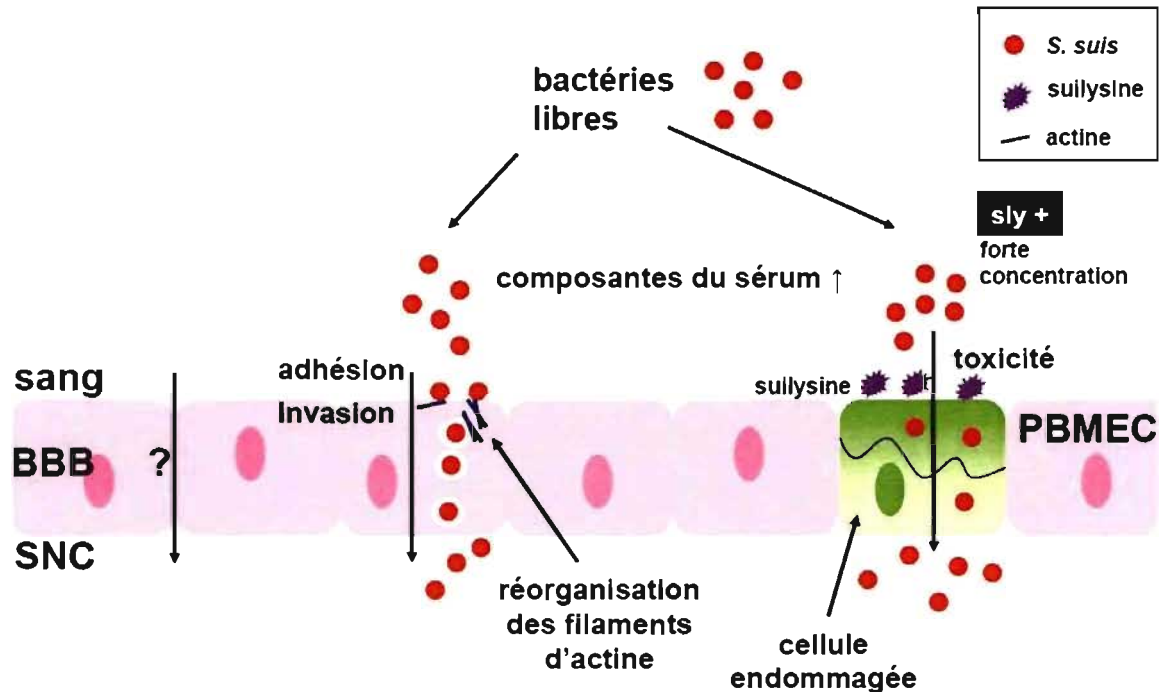


Figure 3. Interactions entre *S. suis* et les PBMEC. Les bactéries libres adhèrent aux PBMEC et les envahissent (invasion transcellulaire). On le retrouve à l'intérieur de vacuoles (microscopie électronique). Cette invasion des bactéries à l'intérieur des cellules requiert une réorganisation des filaments d'actine eucaryotes. De plus, les souches produisant la suilysine à fortes concentrations sont toxiques pour les PBMEC et peuvent endommager la BBB. Finalement, le passage de la BBB pourrait aussi se produire de façon paracellulaire, mais ceci reste à démontrer.

2.2) Stimulation de la réponse inflammatoire

Le système immunitaire joue un rôle décisif dans le développement d'une protection contre les pathogènes. Par contre, l'inflammation produite par l'hôte peut être comparée à une arme à double tranchant qui peut à la fois aider à contrôler une infection, mais aussi nuire à la situation en causant des dommages à l'hôte. Ainsi, on rapporte des exemples d'inflammation incontrôlée lors d'infections par des pathogènes causant la méningite et des chocs septiques suivis de détérioration clinique (208, 349). De plus, des observations histopathologiques

indiquent la présence de nécrose dans des vaisseaux sanguins associée à la présence d'agrégats de cellules de la réponse inflammatoire chez des porcs infectés par *S. suis* (277). Chez un animal avec des signes cliniques de méningite à *S. suis*, un traitement anti-inflammatoire peut l'aider à recouvrer la santé (158).

De plus, plusieurs cytokines pro-inflammatoires et chimiokines sont connues pour altérer les jonctions serrées (TJ) de la BBB, activer et attirer des leucocytes au site de l'inflammation. Nos recherches se sont portées sur la capacité que *S. suis* d'induire la sécrétion de telles cytokines par les PBMEC. Nos résultats démontrent que *S. suis* stimule les cellules endothéliales porcines de BBB à sécréter des médiateurs pro-inflammatoires telles que IL-6 et IL-8 (Article III). La production d'IL-6 par PBMEC stimulées est similaire à celles de cellules monocytaires et endothéliales humaines stimulées par *S. suis* (298, 351). L'IL-6 est un médiateur clé de la réponse inflammatoire chez le porc (118) et elle est considérée comme un marqueur spécifique de méningite (112, 240). Elle peut induire une augmentation de la perméabilité de la BBB en altérant les TJ, ce qui se reflète par une diminution de la TEER (79, 220).

Bien que des profils inhabituels de production d'IL-8 aient été observés (ce point est discuté plus bas), on peut affirmer que les PBMEC produisent bien l'IL-8 en réponse à *S. suis* et que cette production est beaucoup plus forte que celle des BMEC (351). L'IL-8 (CXCL8) est une chimiokine à motif CXC qui attire les neutrophiles au site de l'inflammation en plus de les activer et de les pousser à exprimer des molécules d'adhésion (241). Elle induit aussi l'expression de molécules d'adhésion chez des cellules endothéliales (241). Ainsi, son expression par des cellules endothéliales de cerveau est considérée comme un événement clé pour l'initiation de la translocation des leucocytes au travers de la BBB (317). D'ailleurs, *E. coli* K1 induit l'expression d'IL-8 chez des BMEC humaines (122).

Lorsqu'on utilise différentes composantes bactériennes, on observe que la paroi cellulaire active effectivement les PBMEC pour produire l'IL-6 et l'IL-8 (Article III). Ce potentiel stimuloire de la paroi cellulaire de *S. suis* avait aussi été rapporté pour les BMEC humaines (351) et des macrophages murins (297). Par ailleurs, en entravant le pouvoir stimuloire de la paroi cellulaire bactérienne, la

présence de la CPS interfère avec les interactions de *S. suis* avec les PBMEC (Article III). Cependant, le LTA purifié de *S. suis* n'a pas induit la sécrétion de cytokines par les PBMEC (Article III), ce qui est en contradiction avec d'autres études démontrant que le LTA des bactéries à Gram positif induisait une réponse inflammatoire (316). Nos résultats pourraient s'expliquer par la nécessité de la présentation à la surface bactérienne du LTA des streptocoques pour son activité stimuloire qui a été rapportée récemment par Draing *et al.* (93). Par ailleurs, il est aussi possible que l'activation causée par la paroi cellulaire de *S. suis* soit due à d'autres composantes comme le peptidoglycan (239).

Bien que la paroi cellulaire semble avoir un certain effet stimulateur sur les PBMEC, c'est la suilysine qui est majoritairement responsable de cet effet chez les souches capsulées, lorsqu'elle est produite (Article III). Ces résultats sont en accord avec d'autres études démontrant que des hémolysines de la même famille que la suilysine, comme la listériolysine, pneumolysine et la streptolysine O, i.e. la famille des cytolysines liant le cholestérol et activée par les groupements thiol, stimulent aussi la réponse inflammatoire de l'hôte (64, 193, 237). Au meilleur de nos connaissances, il s'agit de la première étude rapportant le rôle clé de la suilysine dans l'inflammation de la BBB porcine (Article III). Ainsi, bien que des études antérieures effectuées au laboratoire et ailleurs aient rapporté la capacité de la suilysine à stimuler les cellules (monocytes, macrophages, cellules du sang complet porcin (214, 299)), son rôle prépondérant n'avait pas été mis en évidence jusqu'à présent. Nous attribuons cette différence aux types cellulaires utilisés et à l'utilisation de souches vivantes en opposition à l'utilisation antérieure de souches tuées à la chaleur.

La suilysine possède donc un éventail de propriétés caractéristiques pouvant aider à *S. suis* à atteindre et à traverser la BBB en interagissant avec des cellules, mais aussi avec d'autres cellules du système immunitaire. Ainsi, en plus d'endommager les cellules endothéliales de la BBB (Article I), elle les stimule à sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Article III) (351) et de l'acide arachidonique (182). Elle aiderait donc le passage à travers la BBB non seulement en l'endommageant directement, mais aussi en provoquant un influx potentiel de

leucocytes avec lequel la bactérie pourrait traverser la BBB. De plus, la suilysine interfère avec la capacité des neutrophiles à tuer *S. suis* (44), ce qui pourrait l'aider à survivre en présence de ces cellules attirées au site de l'inflammation par des molécules chimioattractantes telles IL-8.

Par ailleurs, les PBMEC n'ont pas produit de niveaux détectables d'IL-1 β et de TNF- α dans aucune des conditions testées (incluant l'utilisation d'un contrôle positif) (Article III). Des résultats similaires avaient été obtenus au laboratoire à la suite de l'utilisation de BMEC humaines (351). Récemment, Dominguez-Punaro *et al.* (86) n'ont détecté aucun signal positif de transcription pour ces deux cytokines dans des coupes coronales de cerveaux de souris infectées par *S. suis* en utilisant l'hybridation *in situ*. Les BMEC humaines ou porcines pourraient donc être incapables d'en produire, du moins à des niveaux détectables. On ne peut donc pas tirer de conclusion face au pouvoir stimulateur *S. suis* pour ces cytokines.

Dans un même ordre d'idée, il aurait été intéressant vérifier si les PBMEC étaient capables de sécréter d'autres cytokines pro-inflammatoires et chimiokines. Ainsi, il est intéressant de noter que la chimiokine MCP-1 (CCL2) peut augmenter la perméabilité de la BBB en altérant les TJ (315). De plus, *S. suis* induit la sécrétion de MCP-1 par des BMEC humaines (351). Cependant, dans la présente étude, nous n'avons pas testé si les PBMEC pouvaient également sécréter MCP-1 en réponse à *S. suis* étant donné la non disponibilité sur le marché d'anticorps dirigés contre la MCP-1 porcine pouvant être utilisés dans un test ELISA. De plus, la détection à la suite de la stimulation par *S. suis* de GM-CSF (facteur stimulateur de colonies de granulocytes et de macrophages) aurait également été intéressante à effectuer puisque le GM-CSF est sécrété par les BMEC à la suite de leur stimulation avec du LPS de *E. coli* ainsi qu'avec GBS et sa toxine beta-hémolysine/cytolysine (90, 357).

Bien que l'identité des récepteurs cellulaires nécessaires à l'activation des PBMEC n'ait pas été recherchée dans la présente étude, nous supposons que le récepteur TLR2, un récepteur reconnaissant la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif (99), pourrait être impliqué dans cette activation. Ainsi, Dominguez-Punaro *et al.* (86) ont observé l'activation transcriptionnelle de TLR2, CD14 et I κ B α

(un indice de l'activation de NF- κ B) et MCP-1 dans les microvaisseaux sanguins de coupes de cerveau de souris infectées par *S. suis*. Par ailleurs, Graveline *et al.* (139) ont rapporté que *S. suis* utilisait le récepteur TLR2 pour stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires chez des monocytes humains. De plus, il a été démontré que les BMEC exprimaient le TLR2 (89). Une étude effectuée au laboratoire a d'ailleurs démontré que *S. suis* ne stimulait pas la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules HUVEC (351). D'ailleurs, il est intéressant de noter que les HUVEC expriment très peu de TLR2 à leur surface (109), ce qui est en accord avec notre hypothèse. Toutefois, d'autres études sont nécessaires à la confirmation de cette hypothèse.

Dans un contexte *in vivo*, les BMEC de la BBB ne sont pas les seules à sécréter des cytokines. Ainsi, les cellules de la microglia, les astrocytes et les leucocytes attirés au site de l'inflammation sont aussi responsables de la présence de cytokines (206, 265, 353). Les PBMEC pourraient donc être activées par des cytokines produites par d'autres cellules (stimulation paracrine) en plus de la stimulation directe causée par *S. suis* (353). D'ailleurs, *S. suis* est capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de la microglie (M.C. Dominguez-Punaro, communication personnelle), des monocytes (298), des macrophages (300) et des cellules porcines de sang complet (299). Des monocytes stimulés par *S. suis* expriment aussi plus de molécules d'adhésion, ce qui pourrait aider à leur recrutement aux sites de l'inflammation et à leur passage au travers de la BBB (6). La BBB est aussi reconnue pour sa modulation, à la suite de sa stimulation, de l'expression de molécules d'adhésion pouvant interagir avec les leucocytes (381).

Des profils de production d'IL-8 inhabituels ont été observés chez les PBMEC (Article III). L'utilisation de différentes souches, d'un système rapporteur et d'inhibiteurs spécifiques de protéases suggèrent que la baisse des niveaux d'IL-8 dans le temps chez certaines souches serait causée par une activité sérine protéase sécrétée par *S. suis*, que nous nommerons protéase à IL-8 (Article III). De plus, nous avons démontré la disparition d'une bande de 9 kDa correspondant à l'IL-8 porcine en utilisant l'électrophorèse sur gel suivie d'une coloration au

nitrate d'argent ou d'immunobuvardage (Article III). Récemment, la production de plusieurs protéases telles que l'Arg-aminopeptidase, une activité pseudo-chymotrypsine, une activité caséinase, une dipeptidyl peptidase IV, une activité phospholipase C et une hyaluronate lysase a d'ailleurs été démontrée chez *S. suis* (8, 182, 184). Chez plusieurs pathogènes, des protéases participent à la virulence en étant nécessaires pour l'acquisition du fer (40) et pour la destruction de tissus (188) et de molécules du système immunitaire telles que des Ig (66) et des facteurs du complément (54).

Un seul autre exemple d'une telle protéase clivant des chimiokines CXC chez les streptocoques a été répertorié très récemment à la suite de l'observation de lésions nécrotiques contenant beaucoup de bactéries, mais pas d'infiltration de neutrophiles chez des patients atteints de GAS (154). Il s'agit de la protéase ScpC (aussi connue sous le nom de SpyCEP) de *S. pyogenes* (101, 154, 155). Cette dernière est différente de la C5a peptidase (ScpA) et de la cystéine protéase SpeB qui sont également produites par *S. pyogenes* (154). La ScpC clive plusieurs chimiokines à motif CXC dont l'IL-8 humaine, la KC et la MIP-2 murines et la chimiokine LIX, mais pas les chimiokines à motif CC comme la RANTES (155). La ScpC clive l'IL-8 humaine en deux fragments de ~6 and ~2 kDa (101) la rendant inactive pour le recrutement des neutrophiles (155). La présence de la ScpC est essentielle à la virulence chez la souris (155). Un gène homologue à celui de ScpC est présent chez tous les génomes séquencés de *S. suis* (Article III). Bien que des infiltrations de neutrophiles soient retrouvées dans le cerveau de porc souffrant de méningite à *S. suis* (56, 288), nous supposons que cette activité protéase chez *S. suis* pourrait avoir des effets similaires (peut-être moins prononcés) à ceux de la protéase de *S. pyogenes*. En inactivant l'IL-8, elle pourrait moduler le processus inflammatoire et retarder la venue au site de l'inflammation des neutrophiles qui sont capables de le tuer (44). Nos résultats ont d'ailleurs démontré que les chimiokines CXC IL-8 porcine et IL-8 humaine (données non-publiées) étaient dégradées par cette activité, mais pas les cytokines TNF- α , IL-1 β et IL-6. Au meilleur de nos connaissances, il s'agit de la première étude faisant état d'une protéase dégradant une chimiokine chez *S. suis*. Un rôle semblable a déjà été suggéré pour la DPP IV de *S. suis* qui pourrait cliver des protéines ayant un X-Pro

ou un X-Ala à leur extrémité N-terminale, ce qui inclut plusieurs cytokines (185). Par contre, ce rôle n'a pas été démontré. D'autres études sont nécessaires pour caractériser l'activité sérine protéase capable de dégrader l'IL-8 porcine décrite dans cette étude (Article III) et son implication dans la pathogenèse de *S. suis* en rapport avec le clivage de l'IL-8. Par exemple, un mutant knock-out pour le gène codant cette protéase (Le gène homologue à celui de la SpcC correspond au gène *ssu0757* chez la souche P1/7.) pourrait être utilisé pour vérifier le rôle dans la virulence de cette protéase. De plus, l'effet sur le recrutement des neutrophiles de l'utilisation d'IL-8 dégradée par *S. suis* ou d'un mutant knock-out pour le gène codant cette protéase pourrait être vérifié en utilisant un test de migration en Tranwell.

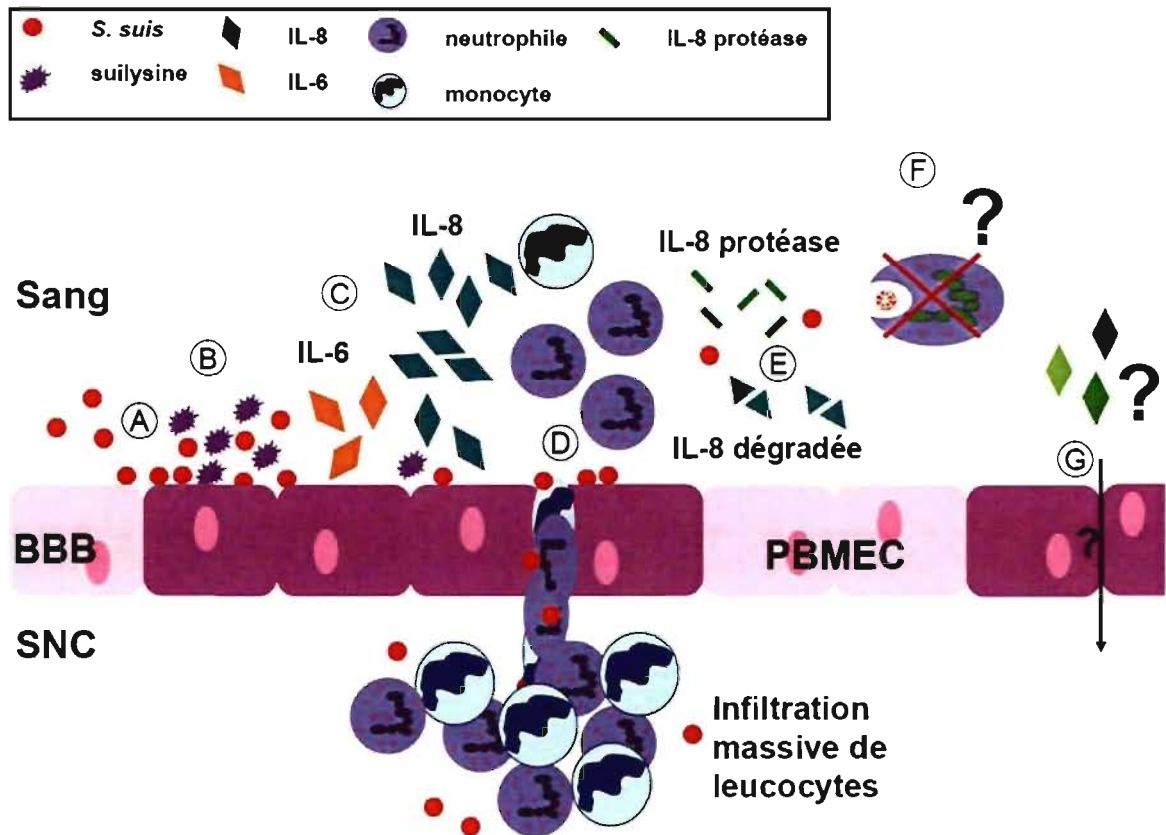


Figure 4. Modèle proposé pour l'inflammation de la BBB causée par *S. suis* et son passage vers le SNC. A) *S. suis* adhère aux cellules de la BBB. B) Les cellules sont activées par la suilysine produite par la bactérie et aussi au contact de la bactérie elle-même. C) Les PBMEC sécrètent l'IL-6 et l'IL-8. D) Ces cytokines attirent des leucocytes au site de l'inflammation et une infiltration massive de leucocytes se produit au niveau de la BBB. *S. suis* peut profiter de cette infiltration

pour traverser la BBB et atteindre le SNC. E) La production d'une protéase à IL-8 dégrade cette cytokine produite par les PBMEC stimulées par *S. suis*. F) Le recrutement des neutrophiles activés pourrait être retardé, ce qui pourrait diminuer la phagocytose et la destruction de *S. suis* par les neutrophiles. G) Au contact de *S. suis* ou de ses composantes sécrétées, les cellules de la BBB pourraient sécréter d'autres cytokines qui pourraient induire le relâchement des jonctions serrées, mais ceci reste à démontrer.

3) Identification de facteurs de virulence potentiels impliqués dans l'invasion des PBMEC.

Certaines composantes bactériennes impliquées dans l'adhésion et l'invasion des PBMEC sont de nature protéique (Article II). Chez les bactéries à Gram positif, plusieurs protéines de surface possédant un motif Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) favorisent les interactions bactériennes avec les tissus de l'hôte et les composantes du plasma (242). Les protéines possédant un motif LPXTG sont ancrées dans la membrane bactérienne par la sortase A (124). *S. suis* possède un gène codant pour une sortase A (*srtA*) ancrant différentes protéines LPXTG à sa paroi cellulaire (256). L'identité et le rôle de toutes ces protéines LPXTG ancrées ne sont pas connus. Chez un mutant $\Delta srtA$, Osaki *et al.* (256) ont démontré l'absence de 15 taches majeures de protéines à la suite d'une séparation sur un gel de polyacrylamide des protéines de la paroi cellulaire. L'identification de certaines de ces taches a mené à l'identification de la protéine MRP (un marqueur de virulence (135)), ainsi que des protéines nouvellement identifiées similaires à des nucléotidases. On rapporte l'existence d'autres protéines LPXTG chez *S. suis* comme le facteur d'opacité de *S. suis* (OFS), un facteur de virulence, (21) et l'antigène de surface un «Sao», une protéine immunogénique (210, 211). Ces protéines sont probablement ancrées par la sortase A bien qu'elles n'aient pas été identifiées par l'étude d'Osaki *et al.* (256).

Chez d'autres pathogènes comme *S. pneumoniae*, GBS et *Streptococcus sanguinis*, la sortase A ancre des protéines impliquées dans les interactions avec les cellules de l'hôte (195, 203, 385). Nos résultats démontrent que c'est aussi le cas chez *S. suis* et que les protéines LPXTG ancrées par cette sortase A sont importantes pour l'adhésion et l'invasion de la bactérie aux PBMEC (Article IV). De plus, l'adhésion à différentes protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine

plasmatique, fibronectine cellulaire et collagène de type I) est aussi partiellement réduite chez *S. suis* à la suite de l'élimination de la sortase A (Article IV). Ceci démontre que parmi les protéines LPXTG ancrées par la sortase A se trouvent des MSCRAMM, tout comme chez GBS (203) et *S. gordonii* (35), qui faciliteraient les interactions entre *S. suis* et les tissus de l'hôte. Par contre, étant donné le niveau d'adhésion résiduel aux protéines de la MEC (Article IV), d'autres composantes sont probablement impliquées dans l'adhésion à ces protéines dont des protéines ne possédant pas de motifs LPXTG (non-MSCRAMM). Ainsi, *S. suis* possède des protéines non-MSCRAMM qui lient les protéines de la MEC telles que la FBPS (76), la protéine de 52 kDa liant les IgG (302) et l' α -énolase (108).

Par ailleurs, la virulence du mutant $\Delta srtA$ de *S. suis* n'est pas diminuée chez la souris (Article IV). Le même résultat a été obtenu chez *S. pneumoniae* (195, 260). En effet, le mutant $\Delta srtA$ et la souche parentale ont été retrouvés à des concentrations similaires et élevées dans le sang (Article IV). La capsule est un facteur antiphagocytaire clé (135) et la CPS du mutant $\Delta srtA$ (Article IV) lui aurait permis de se disséminer au travers de l'organisme. Ces résultats suggèrent que l'ancrage seul des protéines LPXTG ne serait pas suffisant pour expliquer la virulence chez la souris et que bien que ces protéines soient potentiellement impliquées dans plusieurs étapes de la pathogenèse, d'autres éléments tels que des protéines non-LPXTG, sécrétées ou non, ainsi que des éléments de nature non protéique seraient impliqués dans la virulence.

S. suis possède également d'autres sortases mise à part de la sortase A, ce sont des sortases de classe C (SrtB, SrtC, SrtD et SrtE), (95) pourraient elles aussi contribuer à ses interactions avec les cellules de l'hôte. Chez *S. suis*, trois gènes de sortase de classe C (*srtB*, *srtC*, *srtD*) sont contigus dans le génome et sont associés à des gènes codant pour des protéines possédant un motif LPXTG (256). Par contre, les gènes codant pour ces sortases sont présents chez environ 50% des souches virulentes testées (T. Sekizaki, communication personnelle). C'est d'ailleurs dans un gène similaire à un gène codant pour l'une de ces protéines possédant un motif LPXTG qu'a eu lieu l'insertion du transposon chez le mutant B8A qui s'est avéré moins invasif et moins virulent chez la souris et le porc (Article

V). Chez ce mutant, le gène contenant l'insertion du transposon est suivi de quatre autres gènes codant pour des protéines LPXTG qui sont eux-mêmes suivis des gènes pour les trois sortases de classe C décrites précédemment. Fait intéressant, cette région est similaire à l'îlot de pathogénicité *rlrA* qui code pour un pilus chez *Streptococcus pneumoniae* (147, 152, 209), bien qu'elle possède deux protéines LPXTG supplémentaires et qu'aucun gène similaire au régulateur *rlrA* n'ait été trouvé à proximité de l'îlot (données non publiées).



Figure 5: îlot *rlrA* de *S. pneumoniae*. Tirée de Hava *et al.* (147).

Les pili n'ont été rapportés que très récemment chez les bactéries à Gram positif, telles que GAS, GBS et *S. pneumoniae* (94, 333). Ces pili pourraient jouer un rôle dans la virulence qui était resté inconnu jusqu'à tout récemment (333). De plus, une même espèce peut posséder plusieurs îlots codant pour différents pili (333). Bien que les études sur le sujet laissent entendre que l'assemblage des pili se ferait par polymérisation covalente des protéines LPXTG formant des sous-unités majeures et mineures de pili par les sortases de classe C comprises dans le même îlot, bien des questions demeurent sans réponses (333). Dans le cas de *S. suis*, Jacques *et al.* (179) ont rapporté, par microscopie électronique, la présence de structures courtes et minces ressemblant à des pili. Ainsi, nous spéculons que cette région interrompue chez le mutant B8A de *S. suis*, qui est similaire à l'îlot *rlrA*, pourrait servir aussi à la formation d'un pilus et qu'elle jouerait un rôle dans l'invasion des PBMEC et la virulence de la bactérie (Article V). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer quelle(s) sortase(s) du génome de *S. suis* est(sont) responsable(s) de l'ancrage des protéines LPXTG de cette région, s'il y a effectivement la formation de ce pilus potentiel chez *S. suis* et par quelles sortases et comment serait-il assemblé.

En utilisant la capture sélective des séquences transcrites (SCOTS), Fittipaldi *et al.* (113) (*en annexe*) a démontré que l'expression d'un gène codant pour une peptidase signal homologue aux peptidases signal de type LepB des

bactéries à Gram négatif, le gène *ssu0424*, était augmentée suite au contact de la bactérie avec des cellules endothéliales porcines. Chez GBS, une peptidase signal de type LepB est le premier gène d'un îlot codant pour le pilus 2b (333). Chez GBS, les pili participent à l'adhésion aux cellules épithéliales, aux BMEC humaines (94, 223) et aux protéines de la MEC (238). La région similaire décrite par Fittipaldi *et al.* (113) chez *S. suis* est une version tronquée, mais organisée de façon similaire, contenant le gène codant pour la peptidase signal suivi de deux gènes codant pour des protéines LPXTG et un gène codant pour une sortase de classe C (voir la figure 2 de Fittipaldi *et al.* en annexe de cette thèse). Ces observations poussent les auteurs à spéculer sur la fonction de cette région du génome de *S. suis* en proposant qu'il s'agirait d'une région codant pour un pilus et que ces protéines LPXTG pourraient faire lieu de sous-unités pilières majeure et accessoire (113). De plus, les auteurs suggèrent que cette région pourrait être impliquée dans l'adhésion et l'invasion des PBMEC (113).

L'insertion d'un transposon dans le gène *merR* (*ssu0455*) situé en aval du gène *srtE* (*ssu0453*) (256) chez un mutant de *S. suis* a provoqué une baisse de sa capacité d'invasion des PBMEC (Article V). En utilisant la technique de SCOTS, Fittipaldi *et al.* (113) (*en annexe*) ont également démontré que l'expression des gènes *ssu0453* et *ssu0457* de la même région codant pour la sortase E et une collagénase-peptidase, était augmentée à la suite du contact entre *S. suis* et des cellules endothéliales porcines.

Cependant, la participation de SrtE dans la formation d'un pilus est incertaine puisque Osaki *et al.* (256), ainsi que l'analyse des génomes des souches séquencées P1/7 et 89-1591 révèlent qu'il ne semble pas faire partie d'un îlot codant pour un pilus puisqu'il n'est pas entouré de gènes codant pour des protéines LPXTG. De plus, le gène de la *srtE* n'est pas présent chez toutes les souches de *S. suis* (T. Sekizaki, communication personnelle). Par contre, cette région, lorsque présente, pourrait être impliquée dans les interactions de *S. suis* avec les PBMEC, bien que son véritable rôle reste inconnu et qu'il ne soit pas exclu que la SrtE pourrait aider à l'assemblage d'un pilus codé par un autre îlot.

L'insertion du transposon Tn917 dans d'autres gènes codant pour des protéines/enzymes a aussi eu pour effet de diminuer l'adhésion et l'invasion des PBMEC par les mutants de *S. suis* (Article V). Ces gènes codent pour des protéines pouvant être classés dans sept catégories: protéine de surface (incluant le mutant B8A décrit ci haut), transport/liaison, fonctions régulatrices, métabolisme, synthèse d'acides aminés, synthèse de protéines et protéines hypothétiques.

Tableau 1: Gènes interrompus par l'insertion du transposon Tn917 chez les mutants de *S. suis* moins invasifs avec les PBMEC.

Mutant	Gène ^a	Fonction putative (Organisme)
<u>Protéine de surface</u>		
<i>B8A</i>	<i>ssu1889</i>	Domaine d'ancrage à la paroi cellulaire possédant un motif LPXTG (<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>cytotoxis</i> NVH 391-98)
<u>Transport/liaison</u>		
<i>F8D</i>	<i>ssu0835</i>	Composante ATPase d'un système de transport multiple de type ABC (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<i>H4F</i>	<i>ssu0833</i>	Protéine putative d'un opéron bactériocine (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<u>Fonctions régulatrices</u>		
<i>B9B</i>	<i>ssu0828</i>	Régulateur de réponse constitué d'un domaine récepteur de type CheY et d'un domaine à hélice liant l'ADN (<i>S. suis</i> 98HAH33)
<i>G7E</i>	<i>ssu1005</i>	Protéine régulatrice, GntR (<i>S. suis</i> 89/1591)
<i>I10B</i>	<i>ssu0455</i>	Protéine régulatrice putative de résistance au mercure <i>merR</i> (<i>S. suis</i>)
<u>Métabolisme</u>		
<i>B1A</i>	<i>ssu0199</i>	Composante IIC d'un système de phosphotransférase spécifique à la cellobiose (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<i>B2D and C3A</i>	<i>ssu0890</i>	Aldose 1-épimérase (<i>S. suis</i> 89/1591)
<i>D12D</i>	<i>ssu1175</i>	Lactoylglutathione lyase et lyases apparentées (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<i>E5H</i>	<i>ssu0990</i>	NUDIX hydrolase (<i>S. suis</i> 89/1591)
<i>H3H</i>	<i>ssu0797</i>	Déshydrogénase à chaîne courte (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<u>Synthèse d'acides aminés</u>		
<i>E12F</i>	<i>ssu0838</i>	Carbamoylphosphate synthase, grande sous-unité (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<i>J7E</i>	<i>ssu1611</i>	Aspartokinase (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<i>H3F</i>	<i>ssu0411</i>	Shikimate kinase (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<u>Synthèse de protéines</u>		
<i>E7A</i>	<i>ssu0470</i>	Lysyl-tRNA synthétase de classe-II (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<u>Protéines hypothétiques</u>		
<i>A8E et E12D</i>	<i>ssu0906</i>	Protéine hypothétique (<i>S. suis</i> 05ZYH33)
<i>J2F</i>	<i>ssu0823</i>	Protéine hypothétique (<i>S. suis</i> 98HAH33)

^a Les gènes sont nommés selon la nomenclature utilisée pour le projet de séquençage de la souche P1/7 de *S. suis*.

Les mutants en gras sont ceux dont la virulence a été chez la souris.

Les mutants en italiques sont ceux dont la virulence a été chez le porc.

Dans l'ensemble, ces fonctions générales sont similaires à celles décrites par Fittipaldi *et al.* (113) (en annexe) qui ont vérifié quels gènes de *S. suis* étaient préférentiellement exprimés au contact des PBMEC. De plus, si on joint ces deux listes de gènes (Tableau 1 ci haut et Article V) et qu'on observe les résultats rapportés dans cette thèse, on voit qu'un type particulier de région semble

important pour les interactions entre *S. suis* et les PBMEC : les régions possédant des gènes codant pour des sortases et potentiellement pour les protéines nécessaires à la formation de différents types de pili (excluant la région de la *srtE*). Des études sont cependant nécessaires pour mieux caractériser ces régions et leurs produits, leur présence chez les différentes souches et leur rôle véritable dans les interactions avec les cellules de l'hôte et la virulence.

Chez plusieurs pathogènes tels que *S. gordonii*, *Pseudomonas fluorescens* et *Agrobacterium tumefaciens*, les transporteurs de type ABC jouent différents rôles physiologiques, mais ils peuvent aussi contribuer à leur virulence en sécrétant des toxines ou des agents anti-microbiens, en participant aux interactions avec des cellules ou des surfaces ou au développement de biofilm (75, 164, 229, 236). Nos résultats indiquent qu'un transporteur ABC semble être important pour l'adhésion et l'invasion des PBMEC par *S. suis* tel que démontré par la baisse de ces interactions chez le mutant F8D chez qui l'insertion du transposon Tn917 s'est produite dans un gène similaire à un gène codant pour la composante ATPase de ce transporteur. De plus, ce mutant s'est avéré moins virulent chez la souris et le porc démontrant l'importance de ce transporteur *in vivo* (Article V). En fait, la région codant pour ce gène semble elle-même importante puisque l'insertion dans un second gène faisant partie de cette région et codant pour une protéine potentielle d'un opéron bactériocine a causé une diminution de l'adhésion et l'invasion des PBMEC (bien que la virulence de ce mutant n'ait pas été testée). Ce transporteur est homologue à la sous-famille d'ABC transporteurs BcrA qui sont impliqués dans la résistance à la bacitracine (266) et dont le rôle dans la formation de biofilm a été rapporté pour certains de ses membres (333). De plus, ces deux gènes sont homologues à des gènes formant un ABC transporteur dans le régulon de la bactériocine streptococcine A-FF22 de GAS (231). D'ailleurs, il a déjà été rapporté que *S. suis* a la capacité de former un biofilm (142) et en plus de produire des substances similaires à des bactériocines (232).

La fonction de ce transporteur dans les interactions avec les cellules de l'hôte et dans la virulence *in vivo*, ainsi que la nature de son substrat et de cette

région restent à déterminer. Un gène de fonction similaire, ici un gène codant pour une protéine liant l'ATP faisant partie d'un ABC transporteur différent, a été rapporté par Fittipaldi *et al.* (113) comme étant exprimé préférentiellement au contact des PBMEC.

Par contre, la diminution de l'adhésion et de l'invasion des PBMEC, n'a pas eu pour effet de réduire la virulence de trois mutants chez la souris (gènes codant pour une protéine hypothétique, une NUDIX hydrolase et un régulateur MerR). L'implication d'une NUDIX hydrolase dans l'invasion des BMEC humaines a déjà été rapportée chez *E. coli* (33). La séquence traduite en acides aminés du gène muté chez *S. suis* (*ssu0990*) contient une boîte NUDIX qui la rend similaire au facteur de virulence NudA de *Legionella pneumophila* (100) qui transforme les diadénosine polyphosphates en ATP et en ADP. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'effet exact de la mutation chez le gène codant pour cette hydrolase pour expliquer l'augmentation de la virulence de ce mutant chez la souris (Article V). Pour ce qui est du mutant chez qui le gène codant pour le régulateur transcriptionnel MerR a été interrompu, une étude très récente de Rosch *et al.* (284) a jeté une nouvelle lumière sur nos résultats de virulence augmentée chez la souris (Article V). En effet, Rosch *et al.* ont démontré qu'en l'absence du régulateur transcriptionnel MerR, l'expression des gènes codant pour les protéines sous-unitaires du pilus codé par l'îlot *rlrA* de *S. pneumoniae* était augmentée (284). Nous supposons qu'une régulation similaire pourrait avoir lieu chez *S. suis* par le répresseur potentiel MerR sur l'îlot des gènes contenant des protéines LPXTG et les sortases B, C et D décrit dans cette thèse (mutant B8A), ainsi que d'autres protéines jouant un rôle potentiel dans la virulence de *S. suis*.

Ainsi, une réduction de l'invasion cellulaire *in vitro* ne correspond pas toujours à une réduction de la virulence *in vivo*. Ce manque de corrélation peut être expliqué par plusieurs facteurs. Ainsi, les modèles *in vivo* sont plus complexes et mettent en jeu une pathogenèse complète faisant intervenir plusieurs autres paramètres. Il aurait été intéressant de vérifier la virulence *in vivo* de tous les mutants par transposition moins virulents avec les PBMEC qui ont été identifiés.

V. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

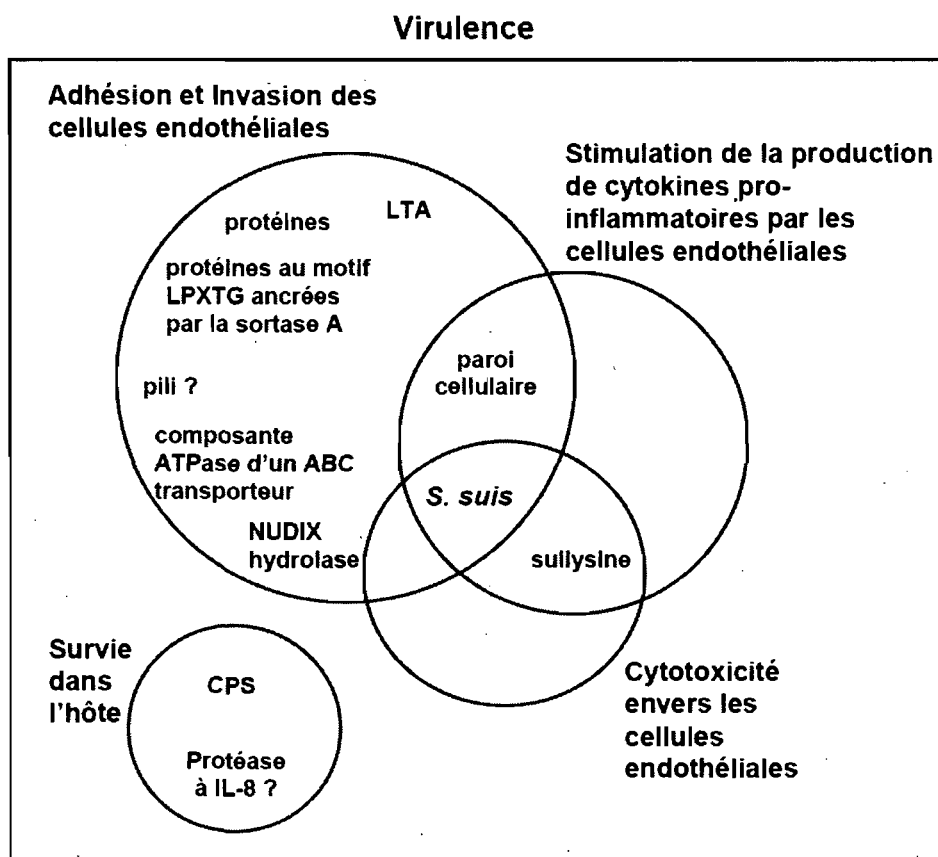


Figure 6. Implication des différentes composantes de *S. suis* dans les interactions avec les cellules endothéliales de la BBB et dans la survie à l'intérieur de l'hôte.

Les travaux réalisés au cours de cette étude représentent une première étape dans la compréhension des mécanismes mis en jeu pour l'atteinte du SNC puisque la pathogenèse est un processus complexe impliquant de nombreuses interactions entre *S. suis* et les cellules de l'hôte.

Les résultats obtenus lors de la présente étude démontrent que :

- *S. suis* pourrait traverser la BBB et atteindre le SNC par plusieurs méthodes. Ainsi, il possède une variété d'outils (Figure 6) pour interagir ou affecter les cellules formant cette barrière.

- *S. suis* pourrait traverser la BBB de façon transcellulaire en adhérant et en envahissant des cellules pour y voyager à l'intérieur d'une vacuole. Pour ce

faire, il utilise des adhésines/invasines de natures diverses (protéines, protéines avec un motif LPXTG, paroi cellulaire, LTA et pilus potentiel) nécessaires à la reconnaissance et à l'entrée à l'intérieur des cellules.

-L'interaction entre *S. suis* et la BBB pourrait occasionner au moins deux conséquence majeure :

- Le bris de la BBB par sa toxine suilysine ayant pour effet d'augmenter la perméabilité de la barrière.

- La stimulation des cellules de la BBB à produire des cytokines pro-inflammatoires (induction de l'inflammation) pour le recrutement de leucocytes vers la BBB. Ainsi, la bactérie pourrait de profiter de ce mouvement massif de leucocytes au travers de la barrière pour se frayer un chemin vers le SNC. La bactérie semble également moduler cet influx à l'aide d'une protéase dégradant l'IL-8.

- Les outils utilisés par *S. suis* pour adhérer, envahir et stimuler les cellules de la BBB (Figure 6) sont potentiellement impliqués dans la virulence de la bactérie. Nos résultats suggèrent que des gènes codant pour un pilus potentiel et une composante ATPase d'un système de transport ABC pourrait être impliqués à la fois dans l'invasion des cellules de la BBB et la virulence.

Lors de son périple à travers l'hôte, la bactérie dispose d'un outil essentiel: la capsule polysaccharidique qui agit comme un bouclier pour protéger la bactérie des cellules phagocytaires. Cette protection apportée par la CPS peut parfois gêner les interactions avec les cellules endothéliales mais sa présence est essentielle à sa survie dans l'hôte.

En plus de fournir réponses sur l'étape clé du passage au travers la BBB dans la pathogenèse de *S. suis*, ce projet apporte également de nouvelles pistes de recherches. Ainsi,

- l'identification des récepteurs à la surface des PBMEC ciblés par *S. suis*,
- l'obtention de mutants par échange allélique pour les gènes identifiés au cours de cette étude et la vérification de leur virulence chez l'hôte,
- l'étude approfondie de la région codant pour un pilus potentiel chez *S. suis* et
- la vérification du rôle des outils utilisés par *S. suis* pour interagir avec les cellules de la BBB envers d'autres types cellulaires pour obtenir vision élargie de leur utilité au niveau de la pathogenèse,

sont des avenues potentielles à la suite de cette thèse.

VI. RÉFÉRENCES

1. **Aarestrup, F. M., S. E. Jorsal, and N. E. Jensen.** 1998. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol* **60**:59-66.
2. **Aarestrup, F. M., S. R. Rasmussen, K. Artursson, and N. E. Jensen.** 1998. Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet Microbiol* **63**:71-80.
3. **Abbott, N. J., and I. A. Romero.** 1996. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today* **2**:106-13.
4. **Abiko, Y., M. Hayakawa, S. Murai, and H. Takiguchi.** 1985. Glycylprolyl dipeptidylaminopeptidase from *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Dental Research* **64**:106-111.
5. **Adam, R. A., T. Tenenbaum, P. Valentin-Weigand, M. Laryea, B. Schwahn, S. Angelow, H. J. Galla, W. Daubener, and H. Schroten.** 2004. Porcine choroid plexus epithelial cells induce *Streptococcus suis* bacteriostasis *in vitro*. *Infect Immun* **72**:3084-7.
6. **Al-Numani, D., M. Segura, M. Dore, and M. Gottschalk.** 2003. Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol* **133**:67-77.
7. **Allen, A. G., S. Bolitho, H. Lindsay, S. Khan, C. Bryant, P. Norton, P. Ward, J. Leigh, J. Morgan, H. Riches, S. Eastty, and D. Maskell.** 2001. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* **69**:2732-5.
8. **Allen, A. G., H. Lindsay, D. Seilly, S. Bolitho, S. E. Peters, and D. J. Maskell.** 2004. Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **36**:327-35.
9. **Allgaier, A., R. Goethe, H. J. Wisselink, H. E. Smith, and P. Valentin-Weigand.** 2001. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *J Clin Microbiol* **39**:445-53.
10. **Alonso-Socas Mdel, M., R. Aleman-Valls, H. Roldan-Delgado, and J. L. Gomez-Sirvent.** 2006. [Endocarditis and spondylodiscitis caused by *Streptococcus suis*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**:354-5.
11. **Alonso, A., and F. Garcia-del Portillo.** 2004. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**:181-91.
12. **Amass, S. F., P. SanMiguel, and L. K. Clark.** 1997. Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *J Clin Microbiol* **35**:1595-6.
13. **Amass, S. F., P. SanMiguel, B. D. Vyverberg, T. W. Huxford, K. E. Know, and L. A. Grote.** 2000. Administration of a homologous bacterin to sows preparturition provided partial protection against streptococcosis in their weaned pigs. *Swine Health Prod* **8**:217-219.
14. **Andersson, B., E. H. Beachey, A. Tomasz, E. Tuomanen, and C. Svanborg-Eden.** 1988. A sandwich adhesion on *Streptococcus*

- pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. Microb. Pathog. **4**:267-278.
15. **Andresen, L. O., and C. Tegtmeier.** 2001. Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. Vet Microbiol **81**:331-44.
 16. **Arends, J. P., N. Hartwig, M. Rudolphy, and H. C. Zanen.** 1984. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. J Clin Microbiol **20**:945-7.
 17. **Arends, J. P., and H. C. Zanen.** 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis. **10**:131-137.
 18. **Asensi, J. M., V. Asensi, M. Arias, A. Moreno, F. Perez, and R. Navarro.** 2001. [*Streptococcus suis* meningitis. Report of two cases and literature review]. Enferm Infecc Microbiol Clin **19**:186-8.
 19. **Badger, J. L., M. F. Stins, and K. S. Kim.** 1999. *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun. **67**:4208-4215.
 20. **Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard.** 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol Dis **16**:1-13.
 21. **Baums, C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand.** 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. Infect Immun **74**:6154-62.
 22. **Baums, C. G., G. J. Verkuhlen, T. Rehm, L. M. Silva, M. Beyerbach, K. Pohlmeier, and P. Valentin-Weigand.** 2007. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. Appl Environ Microbiol **73**:711-7.
 23. **Beachey, E. H.** 1981. Bacterial adherence : adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. J. Infect. Dis. **143**:325-345.
 24. **Belz, G. T., and T. J. Heath.** 1996. Tonsils of the soft palate of young pigs: crypt structure and lymphoepithelium. Anat Rec **245**:102-13.
 25. **Benga, L., P. Friedl, and P. Valentin-Weigand.** 2005. Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **52**:392-5.
 26. **Benga, L., R. Goethe, M. Rohde, and P. Valentin-Weigand.** 2004. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. Cell Microbiol **6**:867-81.
 27. **Benkirane, R., M. G. Gottschalk, and J. D. Dubreuil.** 1997. Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using western blotting. FEMS Microbiol Lett **153**:379-85.
 28. **Benkirane, R., M. G. Gottschalk, M. Jacques, and J. D. Dubreuil.** 1998. Immunochemical characterization of an IgG-binding protein of *Streptococcus suis*. FEMS Immunol Med Microbiol **20**:121-7.
 29. **Bensaid, T., B. Bonnefoi-Kyriacou, C. Dupel-Pottier, O. Bellon, E. Lagier, and H. Chardon.** 2003. [*Streptococcus suis* meningitis following wild boar hunting]. Presse Med **32**:1077-8.
 30. **Bermpohl, D., A. Halle, D. Freyer, E. Dagand, J. S. Braun, I. Bechmann, N. W. Schröder, and J. R. Weber.** 2005. Bacterial programmed cell death

- of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest* **115**:1607-15.
31. **Berthelot-Herault, F., R. Cariolet, A. Labbe, M. Gottschalk, J. Y. Cardinal, and M. Kobisch.** 2001. Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* **65**:196-200.
 32. **Berthelot-Herault, F., H. Morvan, A. M. Keribin, M. Gottschalk, and M. Kobisch.** 2000. Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res* **31**:473-9.
 33. **Bessman, M. J., J. D. Walsh, C. A. Dunn, J. Swaminathan, J. E. Weldon, and J. Shen.** 2001. The gene *ygdP*, associated with the invasiveness of *Escherichia coli* K1, designates a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Ap5A). *J Biol Chem* **276**:37834-8.
 34. **Blouin, C., R. Higgins, M. Gottschalk, and J. Simard.** 1994. Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res* **58**:49-54.
 35. **Bolken, T. C., C. A. Franke, K. F. Jones, G. O. Zeller, C. H. Jones, E. K. Dutton, and D. E. Hruby.** 2001. Inactivation of the *srtA* Gene in *Streptococcus gordonii* Inhibits Cell Wall Anchoring of Surface Proteins and Decreases *In Vitro* and *In Vivo* Adhesion. *Infect Immun* **69**:75-80.
 36. **Bonmarchand, G., P. Massari, G. Humbert, J. Leroy, A. Morel, J. F. Lemeland, and P. Vannier.** 1985. Group R streptococci: wild boars as a second reservoir. *Scand J Infect Dis* **17**:121-2.
 37. **Bowman, G. L., J. A. Kaye, M. Moore, D. Waichunan, N. E. Carlson, and J. F. Quinn.** 2007. BBB impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology* **68**:1809-14.
 38. **Brassard, J., M. Gottschalk, and S. Quessy.** 2001. Decrease of the adhesion of *Streptococcus suis* serotype 2 mutants to embryonic bovine tracheal cells and porcine tracheal rings. *Can J Vet Res* **65**:156-60.
 39. **Braun, S., G. Jechart, U. Emmerling, and W. Ehret.** 2007. [Meningitis caused by *Streptococcus suis*]. *Dtsch Med Wochenschr* **132**:1098-100.
 40. **Brochu, V., D. Grenier, K. Nakayama, and D. Mayrand.** 2001. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral Microbiol Immunol* **16**:79-87.
 41. **Brousseau, R., J. E. Hill, G. Prefontaine, S. H. Goh, J. Harel, and S. M. Hemmingsen.** 2001. *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **67**:4828-33.
 42. **Bungener, W., and R. Bialek.** 1989. Fatal *Streptococcus suis* septicemia in an abattoir worker. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**:306-8.
 43. **Casiano-Colon, A., and R. E. Marquis.** 1988. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* **54**:1318-24.

44. **Chabot-Roy, G., P. Willson, M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* **41**:21-32.
45. **Chang, B., A. Wada, T. Ikebe, M. Ohnishi, K. Mita, M. Endo, H. Matsuo, Y. Asatuma, S. Kuramoto, H. Sekiguchi, M. Yamazaki, H. Yoshikawa, N. Watabe, H. Yamada, S. Kurita, Y. Imai, and H. Watanabe.** 2006. Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. *Jpn J Infect Dis* **59**:397-9.
46. **Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144**:325-332.
47. **Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **68**:637-643.
48. **Chatellier, S., J. Harel, Y. Zhang, M. Gottschalk, R. Higgins, L. A. Devriese, and R. Brousseau.** 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**:581-9.
49. **Chau, P. Y., C. Y. Huang, and R. Kay.** 1983. *Streptococcus suis* meningitis. An important underdiagnosed disease in Hong Kong. *Med J Aust* **1**:414-6, 417.
50. **Cheng, A. F., K. T. Oo, E. K. Li, and G. L. French.** 1987. Septic arthritis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *J Infect* **14**:237-41.
51. **Christensen, P., and G. Kronvall.** 1985. [A case of *Streptococcus suis* meningitis--a new occupational disease in Sweden?]. *Lakartidningen* **82**:119.
52. **Christley, R. M., D. R. Hodgson, R. J. Rose, J. L. Wood, S. W. Reids, K. G. Whitear, and J. L. Hodgson.** 2001. A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J* **33**:256-64.
53. **Chung, J. W., S. J. Hong, K. J. Kim, D. Goti, M. F. Stins, S. Shin, V. L. Dawson, T. M. Dawson, and K. S. Kim.** 2003. 37-kDa Laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* **278**:16857-168562.
54. **Cleary, P. P., U. Prahbu, J. B. Dale, D. E. Wexler, and J. Handley.** 1992. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infect Immun* **60**:5219-5223.
55. **Clements, M. R., D. V. Hamilton, F. A. Clifton-Hadley, and J. F. O'Reilly.** 1982. *Streptococcus suis* type II infection. A new industrial disease? *Practitioner* **226**:323-5.
56. **Clifton-Hadley, F. A.** 1983. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J* **139**:1-5.
57. **Clifton-Hadley, F. A.** 1984. Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Vet Res Commun* **8**:217-27.
58. **Clifton-Hadley, F. A., and T. J. Alexander.** 1980. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type II in pigs. *Vet Rec* **107**:40-1.
59. **Clifton-Hadley, F. A., T. J. Alexander, and M. R. Enright.** 1986. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2: chance contamination of slaughter pigs. *Vet Rec* **118**:274.

60. **Clifton-Hadley, F. A., T. J. Alexander, I. Upton, and W. P. Duffus.** 1984. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *Vet Rec* **114**:513-8.
61. **Clifton-Hadley, F. A., T. J. L. Alexander, and M. Enright.** 1986. Presented at the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners.
62. **Clifton-Hadley, F. A., and M. R. Enright.** 1984. Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *Vet Rec* **114**:584-6.
63. **Cloutier, G., S. D'Allaire, G. Martinez, C. Surprenant, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2003. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet Microbiol* **97**:135-51.
64. **Cockeran, R., C. Durandt, C. Feldman, T. J. Mitchell, and R. Anderson.** 2002. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect Dis* **186**:562-5.
65. **Colaert, J., M. Allewaert, H. Magerman, J. Vandeven, and J. Vandepitte.** 1985. *Streptococcus suis* meningitis in man. First reported observation in Belgium. *Acta Clin Belg* **40**:314-7.
66. **Collin, M., and A. Olsén.** 2001. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect Immun* **69**:7187-7189.
67. **Constantin, D., D. Ala'Aldeent, and S. Murphy.** 2002. Transcriptional activation of nitric oxide synthase-2, and NO-induced cell death, in mouse cerebrovascular endothelium exposed to *Neisseria meningitidis*. *J Neurochem* **81**:270-6.
68. **Coolen, L., J. Dens, E. Baeck, C. Claes, R. L. Lins, H. Verbraeken, and R. Daelemans.** 1989. *Streptococcus suis* meningitis, permanent perceptive deafness and endophthalmitis. *Intensive Care Med* **15**:545.
69. **Cordenonsi, M.** 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol.* **147**:1569-1582.
70. **Correale, J., and A. Villa.** 2007. The blood-brain barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* **40**:148-60.
71. **Couraoud, P. O.** 1998. Infiltration of inflammatory cells through brain endothelium. *Pathol Biol* **46**:176-180.
72. **Courtney, H. S., D. L. Hasty, and J. B. Dale.** 2002. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med* **34**:77-87.
73. **Crain, M. J., W. D. Waltman, 2nd, J. S. Turner, J. Yother, D. F. Talkington, L. S. McDaniel, B. M. Gray, and D. E. Briles.** 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **58**:3293-9.
74. **Cue, D., P. E. Dombek, H. Lam, and P. P. Cleary.** 1998. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* **66**:4593-601.
75. **Davidson, A. L., and J. Chen.** 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**:241-268.

76. **de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* **70**:1319-1325.
77. **De Greeff, A., A. Hamilton, I. C. Sutcliffe, H. Buys, L. Van Alphen, and H. E. Smith.** 2003. Lipoprotein signal peptidase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiology* **149**:1399-407.
78. **de Moor, C. E.** 1963. Septicaemic Infections in Pigs, Caused by Haemolytic Streptococci of New Lancefield Groups Designated R, S and T. *Antonie van Leeuwenhoek* **29**:272-280.
79. **de Vries, H. E., M. C. Blom-Rosemalen, M. van Oosten, A. G. de Boer, T. J. van Berkel, D. D. Breimer, and J. Kuiper.** 1996. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* **64**:37-43.
80. **Dee, S. A., A. R. Carlson, N. L. Winkelman, and M. M. Corey.** 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J Am Vet Med Assoc* **203**:295-9.
81. **Devriese, L. A., and F. Haesebrouck.** 1992. *Streptococcus suis* infections in horses and cats. *Vet Rec* **130**:380.
82. **Devriese, L. A., F. Haesebrouck, P. De Herdt, P. Dom, R. Ducatelle, M. Desmidt, S. Messier, and R. Higgins.** 1994. *Streptococcus suis* infection in birds. *Avian Pathology* **23**:721-724.
83. **Dickie, A. S., D. A. Bremner, P. Y. Wong, J. D. North, and I. D. Robertson.** 1987. *Streptococcus suis* bacteraemia. *N Z Med J* **100**:677-8.
84. **Dinkla, K., M. Rohde, W. T. Jansen, J. R. Carapetis, G. S. Chhatwal, and S. R. Talay.** 2003. *Streptococcus pyogenes* recruits collagen via surface-bound fibronectin: a novel colonization and immune evasion mechanism. *Mol Microbiol* **47**:861-869.
85. **Dobrogowska, D. H., and A. W. Vorbrodtt.** 1999. Quantitative immunocytochemical study of blood-brain barrier glucose transporter (GLUT-1) in four regions of mouse brain. *J. Histochem. Cytochem.* **47**:1021-1030.
86. **Dominguez-Punaro, M. C., M. Segura, M. M. Plante, S. Lacouture, S. Rivest, and M. Gottschalk.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-54.
87. **Donsakul, K., C. Dejthevaporn, and R. Witoonpanich.** 2003. *Streptococcus suis* infection: clinical features and diagnostic pitfalls. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **34**:154-8.
88. **Doran, K. S., J. C. Chang, V. M. Benoit, L. Eckmann, and V. Nizet.** 2002. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J. Infect. Dis.* **185**:196-203.
89. **Doran, K. S., E. G. Engelson, A. Khosravi, H. C. Maisey, I. Fedtke, O. Equils, K. S. Michelsen, M. Arditi, A. Peschel, and V. Nizet.** 2005. Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J Clin Invest* **115**:2499-2507.
90. **Doran, K. S., G. Y. Liu, and V. Nizet.** 2003. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain

- endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* **112**:736-44.
91. **Doube, A., and A. Calin.** 1988. Bacterial endocarditis presenting as acute monoarthritis. *Ann Rheum Dis* **47**:598-9.
 92. **Dragojlovic, J., B. Milosevic, N. Sasic, M. Pelemis, and M. Sasic.** 2005. [*Streptococcus suis* infection--clinical manifestations]. *Med Pregl* **58**:236-9.
 93. **Draing, C., S. Sigel, S. Deininger, S. Traub, R. Munke, C. Mayer, L. Hareng, T. Hartung, S. von Aulock, and C. Hermann.** 2008. Cytokine induction by Gram-positive bacteria. *Immunobiology* **213**:285-96.
 94. **Dramsi, S., E. Caliot, I. Bonne, S. Guadagnini, M. C. Prevost, M. Kojadinovic, L. Lalioui, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot.** 2006. Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* **60**:1401-1413.
 95. **Dramsi, S., P. Trieu-Cuot, and H. Bierne.** 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **156**:289-97.
 96. **Drevets, D. A.** 1999. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect Immun* **67**:3512-7.
 97. **Drevets, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell.** 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* **63**:4268-76.
 98. **Dupas, D., M. Vignon, and C. Geraut.** 1992. *Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease. *J Occup Med* **34**:1102-5.
 99. **Dziarski, R., and D. Gupta.** 2005. Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin Res* **11**:304-10.
 100. **Edelstein, P. H., B. Hu, T. Shinzato, M. A. Edelstein, W. Xu, and M. J. Bessman.** 2005. *Legionella pneumophila* NudA Is a Nudix hydrolase and virulence factor. *Infect Immun* **73**:6567-76.
 101. **Edwards, R. J., G. W. Taylor, M. Ferguson, S. Murray, N. Rendell, A. Wrigley, Z. Bai, J. Boyle, S. J. Finney, A. Jones, H. H. Russell, C. Turner, J. Cohen, L. Faulkner, and S. Sriskandan.** 2005. Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* **192**:783-90.
 102. **Elbers, A. R., U. Vecht, A. D. Osterhaus, J. Groen, H. J. Wisselink, R. J. Diepersloot, and M. J. Tielen.** 1999. Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands. *Vet Q* **21**:50-4.
 103. **Elliott, S. D.** 1966. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM *streptococcus*). *J Hyg (Lond)* **64**:205-12.
 104. **Elliott, S. D., and J. Y. Tai.** 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J. Exp. Med.* **148**:1699-1704.
 105. **Enright, M. R., T. J. L. Alexander, and F. A. Clifton-Hadley.** 1987. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. *Vet Rec* **121**:132-133.
 106. **Esgleas, M., S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* **244**:33-40.

107. **Esgleas, M., Y. Li, M. A. Hancock, J. Harel, J. D. Dubreuil, and M. Gottschalk.** 2007. Isolation and characterization of α -enolase, a new fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. Infect Immun Submitted.
108. **Esgleas, M., Y. Li, J. Harel, J. D. Dubreuil, and M. Gottschalk.** 2006. Presented at the Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, IL, USA.
109. **Faure, E., O. Equils, P. A. Sieling, L. Thomas, F. X. Zhang, C. J. Kirschning, N. Polentarutti, M. Muzio, and M. Arditi.** 2000. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. J Biol Chem **275**:11058-63.
110. **Fauveau, L., Y. Mourtada, and E. Hazouard.** 2007. [Meningoencephalitis related-to *Streptococcus suis* in a butcher: relevance of occupational questionnaire at emergency room]. Ann Fr Anesth Reanim.
111. **Fedorka-Cray, P. J., L. C. Kelley, T. J. Stabel, J. T. Gray, and J. A. Laufer.** 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. Infect Immun **63**:2658-64.
112. **Fida, N. M., J. Al-Mughales, and M. Farouq.** 2006. Interleukin-1alpha, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with sepsis and meningitis. Pediatr Int **48**:118-124.
113. **Fittipaldi, N., M. Gottschalk, G. Vanier, F. Daigle, and J. Harel.** 2007. Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. Appl Environ Microbiol **73**:4359-64.
114. **Fittipaldi, N., T. Sekizaki, D. Takamatsu, J. Harel, M. C. Dominguez-Punaro, and M. Gottschalk.** 2007. Presented at the First Annual Symposium CRIP, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.
115. **Fittipaldi, N., T. Sekizaki, D. Takamatsu, J. Harel, M. D. Dominguez-Punaro, S. Von Aulock, C. Draing, C. Marois, M. Kobisch, and M. Gottschalk.** 2008. D-Alanylation of the Lipoteichoic Acid Contributes to the Virulence of *Streptococcus suis*. Infect Immun.
116. **Fongcom, A., S. Pruksakorn, R. Mongkol, P. Tharavichitkul, and N. Yoonim.** 2001. *Streptococcus suis* infection in northern Thailand. J Med Assoc Thai **84**:1502-8.
117. **Fontaine, M. C., J. Perez-Casal, and P. J. Willson.** 2004. Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect Immun **72**:774-81.
118. **Fossum, C., E. Watrang, L. Fuxler, K. T. Jensen, and P. Wallgren.** 1998. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6. Vet Immunol Immunopathol **64**:161-172.
119. **Francis, K., J. van Beek, C. Canova, J. W. Neal, and P. Gasque.** 2003. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. Expert Rev Mol Med **5**:1-19.
120. **Francois, B., V. Gissot, M. C. Ploy, and P. Vignon.** 1998. Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol **36**:2395.
121. **Freyer, D., R. Manz, A. Ziegenhorn, M. Weih, K. Angstwurm, W. D. Döcke, A. Meisel, R. R. Schumann, G. Schönfelder, U. Dirnagl, and J. R. Weber.** 1999. Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation

- with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* **163**:4308-14.
122. **Galanakis, E., F. Di Cello, M. Paul-Satyaseela, and K. S. Kim.** 2006. *Escherichia coli* K1 induces IL-8 expression in human brain microvascular endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* **17**:260-5.
 123. **Galina, L., U. Vecht, H. J. Wisselink, and C. Pijoan.** 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res* **60**:72-4.
 124. **Gaspar, A. H., L. A. Marraffini, E. M. Glass, K. L. Debord, H. Ton-That, and O. Schneewind.** 2005. *Bacillus anthracis* sortase A (SrtA) anchors LPXTG motif-containing surface proteins to the cell wall envelope. *J Bacteriol* **187**:4646-55.
 125. **Geffner Sclarsky, D. E., R. Moreno Munoz, M. S. Campillo Alpera, F. J. Pardo Serrano, A. Gomez Gomez, and M. D. Martinez-Lozano.** 2001. [*Streptococcus suis* meningitis]. *An Med Interna* **18**:317-8.
 126. **Gillrie, M. R., G. Krishnegowda, K. Lee, A. G. Buret, S. M. Robbins, S. Looareesuwan, D. C. Gowda, and M. Ho.** 2007. Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins. *Blood* **110**:3426-35.
 127. **Gottschalk, M.** 2004. Porcine *Streptococcus suis* strains as potential sources of infections in humans: an underdiagnosed problem in North America? *J Swine Health Prod.* **12**:197-199.
 128. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen.** 1991. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *J Vet Diagn Invest* **3**:60-5.
 129. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, and D. Dubreuil.** 1992. Production and characterization of two *Streptococcus suis* capsular type 2 mutants. *Vet Microbiol* **30**:59-71.
 130. **Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal, and J. Henrichsen.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **27**:2633-6.
 131. **Gottschalk, M., R. Higgins, and S. Quessy.** 1999. Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *J Clin Microbiol* **37**:4202-3.
 132. **Gottschalk, M., A. Lebrun, M. Jacques, and R. Higgins.** 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **28**:2156-8.
 133. **Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith, and U. Vecht.** 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* **62**:75-79.
 134. **Gottschalk, M., S. Petitbois, R. Higgins, and M. Jacques.** 1991. Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can J Vet Res* **55**:302-4.
 135. **Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.* **76**:259-272.

136. **Gottschalk, M., M. Segura, and J. Xu.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal Health Research Reviews* **8**:1-17.
137. **Gottschalk, M. G., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil.** 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* **141**:189-195.
138. **Grab, D. J., G. Perides, J. S. Dumler, K. J. Kim, J. Park, Y. V. Kim, O. Nikolskaia, K. S. Choi, M. F. Stins, and K. S. Kim.** 2005. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect Immun* **73**:1014-22.
139. **Graveline, R., M. Segura, D. Radzioch, and M. Gottschalk.** 2007. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* **19**:375-89.
140. **Greco, R., L. De Martino, G. Donnarumma, M. P. Conte, L. Seganti, and P. Valenti.** 1995. Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. *Res. Microbiol.* **146**:551-560.
141. **Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, J. Daniels, and M. Kuhn.** 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* **68**:3275-9.
142. **Grenier, D., L. Grignon, and M. Gottschalk.** 2007. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet J* doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.005.
143. **Grieb, P., R. E. Forster, D. Strome, C. W. Goodwin, and P. C. Pape.** 1985. O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol.* **58**:1929-1941.
144. **Gruening, P., M. Fulde, P. Valentin-Weigand, and R. Goethe.** 2006. Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **188**:361-9.
145. **Haataja, S., K. Tikkanen, J. Liukkonen, C. Francois-Gerard, and J. Finne.** 1993. Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J Biol Chem* **268**:4311-7.
146. **Halbur, P., R. Thanawongnuwech, G. Brown, J. Kinyon, J. Roth, E. Thacker, and B. Thacker.** 2000. Efficacy of antimicrobial treatments and vaccination regimens for control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Streptococcus suis* coinfection of nursery pigs. *J Clin Microbiol* **38**:1156-60.
147. **Hava, D. L., C. J. Hemsley, and A. Camilli.** 2003. Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae* *rlrA* pathogenicity islet by RlrA. *J Bacteriol* **185**:413-21.
148. **Hay, P. E., J. G. Cuniffe, G. Kramer, A. J. France, J. A. Gray, and B. Watt.** 1989. Two cases of *Streptococcus suis* meningitis. *Br J Ind Med* **46**:352-3.
149. **Hayakawa, Y., H. Komae, H. Ide, H. Nakagawa, Y. Yoshida, M. Kamada, Y. Kataoka, and M. Nakazawa.** 1993. An occurrence of equine transport pneumonia caused by mixed infection with *Pasteurella caballi*, *Streptococcus suis* and *Streptococcus zooepidemicus*. *J Vet Med Sci* **55**:455-6.

150. **Heath, P. J., B. W. Hunt, J. P. Duff, and J. D. Wilkinson.** 1996. *Streptococcus suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet Rec* **139**:450-1.
151. **Heidt, M. C., W. Mohamed, T. Hain, P. R. Vogt, T. Chakraborty, and E. Domann.** 2005. Human infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *J Clin Microbiol* **43**:4898-901.
152. **Hemsley, C., E. Joyce, D. L. Hava, A. Kawale, and A. Camilli.** 2003. MgrA, an orthologue of Mga, Acts as a transcriptional repressor of the genes within the *rlrA* pathogenicity islet in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**:6640-7.
153. **Hertzog, T., M. Weber, L. Greiffenberg, B. S. Holthausen, W. Goebel, K. S. Kim, and M. Kuhn.** 2003. Antibodies present in normal human serum inhibit invasion of human brain microvascular endothelial cells by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **71**:95-100.
154. **Hidalgo-Grass, C., M. Dan-Goor, A. Maly, Y. Eran, L. A. Kwinn, V. Nizet, M. Ravins, J. Jaffe, A. Peyser, A. E. Moses, and E. Hanski.** 2004. Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections. *Lancet* **363**:696-703.
155. **Hidalgo-Grass, C., I. Mishalian, M. Dan-Goor, I. Belotserkovsky, Y. Eran, V. Nizet, A. Peled, and E. Hanski.** 2006. A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *Embo J* **25**:4628-37.
156. **Hidalgo, A., F. Ropero, R. Palacios, V. Garcia, and J. Santos.** 2007. Meningitis due to *Streptococcus suis* with no contact with pigs or porcine products. *J Infect.*
157. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 2001. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J* **42**:223.
158. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 2005. Streptococcal Diseases, p. 769-783. *In* B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University, Ames, Iowa.
159. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1999. Streptococcal Diseases, p. 563-570. *In* B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University, Ames.
160. **Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**:249-52.
161. **Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun, and J. Henrichsen.** 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* **7**:405-6.
162. **Higgins, R., M. Gottschalk, K. R. Mittal, and M. Beaudoin.** 1990. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can. J. Vet. Res.* **54**:170-173.
163. **Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh.** 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* **107**:63-9.
164. **Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, J. L. Ramos, and G. A. O'Toole.** 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* **49**:905-18.

165. **Hippenstiel, S., and N. Suttorp.** 2003. Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb. Haemost.* **89**:18-24.
166. **Hirase, T., J. M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita, and L. L. Rubin.** 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **110**:1603-1613.
167. **Holt, M. E., M. R. Enright, and T. J. L. Alexander.** 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Rev Vet Sci* **45**:349-52.
168. **Hommeze, J., J. Wullepit, P. Cassimon, F. Castryck, K. Ceyssens, and L. A. Devriese.** 1988. *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *Vet Rec* **123**:626-7.
169. **Hu, X., F. Zhu, H. Wang, S. Chen, G. Wang, J. Sun, C. Hua, and H. Yang.** 2000. [Studies on human streptococcal infectious syndrome caused by infected pigs]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **34**:150-2.
170. **Huang, S. H., and A. Y. Jong.** 2001. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell. Microbiol.* **3**:277-287.
171. **Huang, Y. T., L. J. Teng, S. W. Ho, and P. R. Hsueh.** 2005. *Streptococcus suis* infection. *J Microbiol Immunol Infect* **38**:306-13.
172. **Huber, J. D., R. D. Egleton, and T. P. Davis.** 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosciences* **24**:719-25.
173. **Huber, J. D., K. A. Witt, S. Hom, R. D. Egleton, K. S. Mark, and T. P. Davis.** 2001. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **280**:H1241-H1248.
174. **Ip, M., K. S. Fung, F. Chi, E. S. Cheuk, S. S. Chau, B. W. Wong, S. Lui, M. Hui, R. W. Lai, and P. K. Chan.** 2007. *Streptococcus suis* in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**:15-20.
175. **Isberg, R. R., and J. M. Leong.** 1990. Multiple b1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**:861-871.
176. **Itoh, M.** 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* **147**:1351-1363.
177. **Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg, and P. K. Storm.** 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **62**:1742-1748.
178. **Jacobs, A. A., A. J. van den Berg, and P. L. Loeffen.** 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec* **139**:225-8.
179. **Jacques, M., M. Gottschalk, B. Foiry, and R. Higgins.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **172**:2833-8.
180. **Jansen, J., and C. A. van Dorssen.** 1951. Meningitis en encephalitis bij varkens door streptococci. *Tijdschr Diergeneesk* **76**:815-832.
181. **Jobin, M. C., J. Brassard, S. Quessy, M. Gottschalk, and D. Grenier.** 2004. Acquisition of host plasmin activity by the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:606-10.

182. **Jobin, M. C., J. Fortin, P. J. Willson, M. Gottschalk, and D. Grenier.** 2005. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **252**:105-11.
183. **Jobin, M. C., M. Gottschalk, and D. Grenier.** 2006. Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **40**:29-34.
184. **Jobin, M. C., and D. Grenier.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**:113-9.
185. **Jobin, M. C., G. Martinez, J. Motard, M. Gottschalk, and D. Grenier.** 2005. Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **187**:795-9.
186. **Join-Lambert, O. F., S. Ezine, A. Le Monnier, F. Jaubert, M. Okabe, P. Berche, and S. Kayal.** 2005. *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell Microbiol* **7**:167-80.
187. **Ju, Y., T. Wang, Y. Li, W. Xin, S. Wang, and J. Li.** 2007. Coxsackievirus B3 affects endothelial tight junctions: possible relationship to ZO-1 and F-actin, as well as p38 MAPK activity. *Cell Biol Int* **31**:1207-13.
188. **Juarez, Z. E., and M. W. Stinson.** 1999. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *Infect Immun* **67**:271-8.
189. **Kataoka, Y., C. Sugimoto, M. Nakazawa, T. Morozumi, and M. Kashiwazaki.** 1993. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan farm 1987 to 1991. *J. Vet. Med. Sci.* **55**:623-626.
190. **Kataoka, Y., T. Yoshida, and T. Sawada.** 2000. A 10-year survey of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from swine in Japan. *J Vet Med Sci* **62**:1053-7.
191. **Katsumi, M., T. Saito, Y. Kataoka, T. Itoh, N. Kikuchi, and T. Hiramune.** 1996. Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from *Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. *J Vet Med Sci* **58**:947-52.
192. **Kay, R., A. F. Cheng, and C. Y. Tse.** 1995. *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. *Qjm* **88**:39-47.
193. **Kayal, S., A. Lilienbaum, C. Poyart, S. Memet, A. Israel, and P. Berche.** 1999. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**:1709-22.
194. **Keymer, I. F., S. E. Heath, and J. G. Wood.** 1983. *Streptococcus suis* type II infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) family Canidae. *Vet Rec* **113**:624.
195. **Kharat, A. S., and A. Tomasz.** 2003. Inactivation of the *srtA* gene affects localization of surface proteins and decreases adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal cells in vitro. *Infect Immun* **71**:2758-65.
196. **Kilpper-Bälz, R., and K. Heinz Schleifer.** 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:160-162.

197. **Kim, K. S.** 2002. Strategy of *Escherichia coli* for Crossing the Blood-Brain Barrier. *J Infect Dis* **186**:S220-4.
198. **King, S. J., A. G. Allen, D. J. Maskell, C. G. Dowson, and A. M. Whatmore.** 2004. Distribution, genetic diversity, and variable expression of the gene encoding hyaluronate lyase within the *Streptococcus suis* population. *J Bacteriol* **186**:4740-7.
199. **King, S. J., P. J. Heath, I. Luque, C. Tarradas, C. G. Dowson, and A. M. Whatmore.** 2001. Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infect Immun* **69**:7572-82.
200. **Kniesel, U., and H. Wolburg.** 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **20**:57-76.
201. **Kopic, J., M. T. Paradzik, and N. Pandak.** 2002. *Streptococcus suis* infection as a cause of severe illness: 2 cases from Croatia. *Scand J Infect Dis* **34**:683-4.
202. **Kurl, D. N., S. Haataja, and J. Finne.** 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **57**:384-9.
203. **Lalioui, L., E. Pellegrini, S. Dramsi, M. Baptista, N. Bourgeois, F. Doucet-Populaire, C. Rusniok, M. Zouine, P. Glaser, F. Kunst, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot.** 2005. The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect Immun* **73**:3342-50.
204. **Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146**:1913-1921.
205. **Langford, P., A. E. Williams, and J. S. Kroll.** 1991. Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett.* **61**:347-350.
206. **Lassmann, H.** 1997. Basic mechanisms of brain inflammation. *J Neural Transm Suppl* **50**:183-190.
207. **Leelarasamee, A., C. Nilakul, S. Tien-Grim, S. Srifuengfung, and W. Sussaengrat.** 1997. *Streptococcus suis* toxic-shock syndrome and meningitis. *J Med Assoc Thai* **80**:63-8.
208. **Leib, S. L., and M. G. Tauber.** 1999. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* **13**:527-48, v-vi.
209. **LeMieux, J., D. L. Hava, A. Basset, and A. Camilli.** 2006. RrgA and RrgB are components of a multisubunit pilus encoded by the *Streptococcus pneumoniae* *rlrA* pathogenicity islet. *Infect Immun* **74**:2453-6.
210. **Li, Y., M. Gottschalk, M. Esgleas, S. Lacouture, J. D. Dubreuil, P. Willson, and J. Harel.** 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* doi:10.1128/CVI.00046-07.
211. **Li, Y., G. Martinez, M. Gottschalk, S. Lacouture, P. Willson, J. D. Dubreuil, M. Jacques, and J. Harel.** 2006. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun* **74**:305-12.

212. **Liukkonen, J., S. Haataja, K. Tikkanen, S. Kelm, and J. Finne.** 1992. Identification of N-acetylneuraminy l alpha 2-->3 poly-N-acetylactosamine glycans as the receptors of sialic acid-binding *Streptococcus suis* strains. *J Biol Chem* **267**:21105-11.
213. **Lopreto, C., H. A. Lopardo, M. C. Bardi, and M. Gottschalk.** 2005. [Primary *Streptococcus suis* meningitis: first case in humans described in Latin America.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23**:110.
214. **Lun, S., J. Perez-Casal, W. Connor, and P. J. Willson.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb. Pathog.* **34**:27-37.
215. **Lun, S., and P. J. Willson.** 2005. Putative mannose-specific phosphotransferase system component IID represses expression of suilysin in serotype 2 *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **105**:169-80.
216. **Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu.** 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* **7**:201-9.
217. **Luque, I., C. Tarradas, A. Arenas, A. Maldonado, R. Astorga, and A. Perea.** 1998. *Streptococcus suis* serotypes associated with different disease conditions in pigs. *Vet Rec* **142**:726-7.
218. **Lutticken, R., N. Temme, G. Hahn, and E. W. Bartelheimer.** 1986. Meningitis caused by *Streptococcus suis*: case report and review of the literature. *Infection* **14**:181-5.
219. **Maclean, A. G., G. E. Belenchia, D. N. Bieniemy, T. A. Moroney-Rasmussen, and A. A. Lackner.** 2005. Simian immunodeficiency virus disrupts extended lengths of the blood--brain barrier. *J Med Primatol* **34**:237-42.
220. **MacInnes, J. I., and R. Desrosiers.** 1999. Agents of the "Suis-ide Diseases" of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* **63**:83-89.
221. **Madsen, L. W., B. Svensmark, K. Elvestad, B. Aalbaek, and H. E. Jensen.** 2002. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J. Comp. Pathol.* **126**:57-65.
222. **Mai, N. T., N. T. Hoa, T. V. Nga, L. D. Linh, T. T. Chau, D. X. Sinh, N. H. Phu, L. V. Chuong, T. S. Diep, J. Campbell, H. D. Nghia, T. N. Minh, N. V. Chau, M. D. de Jong, N. T. Chinh, T. T. Hien, J. Farrar, and C. Schultsz.** 2008. *Streptococcus suis* Meningitis in Adults in Vietnam. *Clin Infect Dis*.
223. **Maisey, H. C., M. Hensler, V. Nizet, and K. S. Doran.** 2007. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol* **189**.
224. **Marie, J., H. Morvan, F. Berthelot-Herault, P. Sanders, I. Kempf, A. V. Gautier-Bouchardon, E. Jouy, and M. Kobisch.** 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *J Antimicrob Chemother* **50**:201-9.
225. **Marra, A., and R. R. Isberg.** 1996. Common entry mechanisms. Bacterial pathogenesis. *Curr Biol* **6**:1084-6.
226. **Martel, A., M. Baele, L. A. Devriese, H. Goossens, H. J. Wisselink, A. Decostere, and F. Haesebrouck.** 2001. Prevalence and mechanism of

- resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus suis* isolates. *Vet Microbiol* **83**:287-97.
227. **Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, and E. Dejana.** 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* **142**:117-27.
 228. **Massey, R. C., M. N. Kantzanou, T. Fowler, N. P. Day, K. Schofield, E. R. Wann, A. R. Berendt, M. Hook, and S. J. Peacock.** 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**:839-51.
 229. **Matthysse, A. G., H. A. Yarnall, and N. Young.** 1996. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **178**:5302-8.
 230. **Mazokopakis, E. E., D. P. Kofteridis, J. A. Papadakis, A. H. Gikas, and G. J. Samonis.** 2005. First case report of *Streptococcus suis* septicaemia and meningitis from Greece. *Eur J Neurol* **12**:487-9.
 231. **McLaughlin, R. E., J. J. Ferretti, and W. L. Hynes.** 1999. Nucleotide sequence of the streptococcin A-FF22 lantibiotic regulon: model for production of the lantibiotic SA-FF22 by strains of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **175**:171-7.
 232. **Melancon, D., and D. Grenier.** 2003. Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Appl Environ Microbiol* **69**:4482-8.
 233. **Michaud, S., R. Duperval, and R. Higgins.** 1996. *Streptococcus suis* meningitis: First case reported in Quebec. *Can J Infect Dis* **7**:329-331.
 234. **Michel, U., R. Zobotke, M. Mäder, and R. Nau.** 2001. Regulation of matrix metalloproteinase expression in endothelial cells by heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**:1914-6.
 235. **Miller, D. W.** 1999. Immunobiology of the blood-brain barrier. *J. Neurovirol.* **5**:570-578.
 236. **Mitrakul, K., C. Y. Loo, C. Gyurko, C. V. Hughes, and N. Ganeshkumar.** 2005. Mutational analysis of the *adcCBA* genes in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* **20**:122-7.
 237. **Mitsui, K., K. Takano, S. Nakatani, H. Nambu, F. Shibata, and H. Nakagawa.** 2002. Chemokine production by rat macrophages stimulated with streptolysin O from *Streptococcus pyogenes*. *Microbiol Immunol* **46**:37-45.
 238. **Mora, M., G. Bensi, S. Capo, F. Falugi, C. Zingaretti, A. G. Manetti, T. Maggi, A. R. Taddei, G. Grandi, and J. L. Telford.** 2005. Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**.
 239. **Moreillon, P., and P. A. Majcherczyk.** 2003. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* **35**:632-41.
 240. **Mukai, A. O., V. L. Krebs, C. J. Bertoli, and T. S. Okay.** 2006. TNF-alpha and IL-6 in the diagnosis of bacterial and aseptic meningitis in children. *Pediatr Neurol* **34**:25-29.

241. **Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima.** 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine and Growth Factor Rev* **9**:9-23.
242. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:174-229.
243. **Nealon, T. J., and S. J. Mattingly.** 1985. Kinetic and chemical analyses of the biologic significance of lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III group B streptococci. *Infect. Immun.* **50**:107-115.
244. **Nghia, H. D., N. T. Hoa, D. Linh le, J. Campbell, T. S. Diep, N. V. Chau, N. T. Mai, T. T. Hien, B. Spratt, J. Farrar, and C. Schultsz.** 2008. Human case of *Streptococcus suis* serotype 16 infection. *Emerg Infect Dis* **14**:155-7.
245. **Nikulin, J., U. Panzner, M. Frosch, and A. Schubert-Unkmeir.** 2006. Intracellular survival and replication of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Int J Med Microbiol* **296**:553-8.
246. **Nizet, V., K. S. Kim, M. Stins, M. Jonas, E. Y. Chi, D. Nguyen, and C. E. Rubens.** 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect. Immun.* **65**:5074-5081.
247. **Nobbs, A. H., B. H. Shearer, M. Drobní, M. A. Jepson, and H. F. Jenkinson.** 2006. Adherence and internalization of *Streptococcus gordonii* by epithelial cells involves beta1 integrin recognition by SspA and SspB (antigen I/II family) polypeptides. *Cell Microbiol* **9**:65-83.
248. **Normile, D.** 2005. Infectious diseases. WHO probes deadliness of China's pig-borne disease. *Science* **309**:1308-9.
249. **Norton, P. M., C. Rolph, P. N. Ward, R. W. Bentley, and J. A. Leigh.** 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**:25-35.
250. **Novick, R. P.** 2000. Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. *Trends Microbiol* **8**:148-51.
251. **Okwumabua, O., O. Abdelmagid, and M. M. Chengappa.** 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiol Lett* **181**:113-21.
252. **Okwumabua, O., and S. Chinnapakkagari.** 2005. Identification of the Gene Encoding a 38-Kilodalton Immunogenic and Protective Antigen of *Streptococcus suis*. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:484-90.
253. **Okwumabua, O., J. S. Persaud, and P. G. Reddy.** 2001. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:251-7.
254. **Oliveira, S., and C. Pijoan.** 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol* **99**:1-12.
255. **Osaki, M., D. Takamatsu, Y. Shimoji, and T. Sekizaki.** 2003. Allelic variation in srtAs of *Streptococcus suis* strains. *FEMS Microbiol Lett* **219**:195-201.
256. **Osaki, M., D. Takamatsu, Y. Shimoji, and T. Sekizaki.** 2002. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **184**:971-82.

257. **Palmer, M.** 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* **39**:1681-1689.
258. **Pardridge, W. M.** 1999. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol* **5**:556-69.
259. **Pardridge, W. M.** 2005. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotech* **30**:57-70.
260. **Paterson, G. K., and T. J. Mitchell.** 2006. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes Infect* **8**:145-53.
261. **Patrick, D., J. Betts, E. A. Frey, R. Prameya, K. Dorovini-Zis, and B. B. Finlay.** 1992. *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. *J Infect Dis* **165**:865-72.
262. **Perch, B., K. Pedersen, and J. Henrichsen.** 1983. Serology of Capsulated Streptococci Pathogenic for Pigs: Six New Serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* **17**:993-996.
263. **Perry, M., and A. Whyte.** 1998. Immunology of the tonsils. *Immunol Today* **19**:414-21.
264. **Perseghin, P., G. Bezzi, P. Troupioti, and M. Gallina.** 1995. *Streptococcus suis* meningitis in an Italian blood donor. *Lancet* **346**:1305-6.
265. **Pfister, H. W., U. Koedel, and R. Paul.** 1999. Acute Meningitis. *Curr Infect Dis Rep* **1**:153-159.
266. **Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, D. Zgur-Bertok, R. Komel, and G. M.** 1995. *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* **16**:969-76.
267. **Poggenborg, R., S. Gaini, P. Kjaeldgaard, and J. J. Christensen.** 2008. *Streptococcus suis*: Meningitis, spondylodiscitis and bacteraemia with a serotype 14 strain. *Scand J Infect Dis* **40**:346-9.
268. **Poyart, C., E. Pellegrini, M. Marceau, M. Baptista, F. Jaubert, M. C. Lamy, and P. Trieu-Cuot.** 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* **49**:1615-1625.
269. **Pracht, D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K. S. Kim, H. F. Jenkinson, R. Nau, and S. Hammerschmidt.** 2005. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* **73**:2680-9.
270. **Prasadarao, N. V., C. A. Wass, S. H. Huang, and K. S. Kim.** 1999. Identification and characterization of a novel Ibe10 binding protein that contributes to *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **67**.
271. **Prasadarao, N. V., C. A. Wass, and K. S. Kim.** 1996. Endothelial cell GlcNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **64**:154-160.
272. **Preissner, K. T., and G. S. Chhatwal.** 2000. Extracellular Matrix and Host Cell Surfaces: Potential sites of Pathogen Interaction, p. 49-65. *In* P.

- Cossart, P. Boquet, S. Normark, and R. Rappuoli (ed.), Cellular Microbiology. ASM Press, Washington.
273. **Quessy, S., P. Busque, R. Higgins, M. Jacques, and J. D. Dubreuil.** 1997. Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. FEMS Microbiol Lett **147**:245-50.
 274. **Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Caya, and R. Higgins.** 1995. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. Infect Immun **63**:1975-9.
 275. **Quessy, S., J. D. Dubreuil, M. Jacques, F. Malouin, and R. Higgins.** 1994. Increase of capsular material thickness following in vivo growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. FEMS Microbiol Lett **115**:19-26.
 276. **Radin, J. N., C. J. Orihuela, G. Murti, C. Guglielmo, P. J. Murray, and E. I. Tuomanen.** 2005. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun **73**:7827-35.
 277. **Reams, R. Y., L. T. Glickman, D. D. Harrington, H. L. Thacker, and T. L. Bowersock.** 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. J Vet Diagn Invest **6**:326-34.
 278. **Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker, and T. L. Bowersock.** 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J Vet Diagn Invest **8**:119-21.
 279. **Reddy, M. A., C. A. Wass, K. S. Kim, D. D. Schlaepfer, and N. V. Prasad Rao.** 2000. Involvement of focal adhesion kinase in *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells. Infect Immun **68**:6423-30.
 280. **Ring, A., and E. Tuomanen.** 2000. Host cell invasion by *Streptococcus pneumoniae*. Subcell. Biochem. **33**:125-135.
 281. **Ring, A., J. N. Weiser, and E. I. Tuomanen.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. J. Clin. Invest. **102**:347-360.
 282. **Riquelme, E., E. Escibano, J. J. Blanch, and M. D. Crespo.** 2008. [Acute *Streptococcus suis* meningitis in a woman working in a meat market.]. Enferm Infecc Microbiol Clin **26**:256-7.
 283. **Robertson, I. D., and D. K. Blackmore.** 1989. Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. Epidemiol Infect **103**:157-64.
 284. **Rosch, J. W., B. Mann, J. Thornton, J. Sublett, and E. Tuomanen.** 2008. Convergence of Regulatory Networks on the Pilus Locus of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun.
 285. **Rosenkranz, M., H. A. Elsner, H. J. Sturenburg, C. Weiller, J. Rother, and I. Sobottka.** 2003. *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. J Neurol **250**:869-70.
 286. **Salasia, S. I., C. Lammler, and G. Herrmann.** 1995. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants. Vet Microbiol **45**:151-6.
 287. **Salles, M. W., J. Perez-Casal, P. Willson, and D. M. Middleton.** 2002. Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt

- epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. Vet Immunol Immunopathol **87**:51-63.
288. **Sanford, S.** 1987. Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs. II. Central nervous system lesions. Can. J. Vet. Res. **51**:486-489.
 289. **Sanford, S. E., and M. E. Tilker.** 1982. *Streptococcus suis* type II-associated diseases in swine: observations of a one-year study. J Am Vet Med Assoc **181**:673-6.
 290. **Schembri, M. A., H. Hasman, and P. Klemm.** 2000. Expression and purification of the mannose recognition domain of the FimH adhesin. FEMS Microbiol Lett **188**:147-151.
 291. **Schlech, W. F., 3rd, Q. Luo, G. Faulkner, and S. Galsworthy.** 1994. Interaction of *Listeria* species with human cell monolayers. Clin Invest Med **17**:9-17.
 292. **Schneeberger, E. E.** 1978. Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb. J Cell Sci **32**:307-324.
 293. **Schubert-Unkmeir, A., O. Sokolova, U. Panzner, M. Eigenthaler, and M. Frosch.** 2007. Gene expression pattern in human brain endothelial cells in response to *Neisseria meningitidis*. Infect Immun. **75**:899-914.
 294. **Segers, R. P., T. Kenter, L. A. de Haan, and A. A. Jacobs.** 1998. Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. FEMS Microbiol. Lett. **167**:255-261.
 295. **Segura, M., and M. Gottschalk.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. Infect. Immun. **70**:4312-4322.
 296. **Segura, M., M. Gottschalk, and M. Olivier.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. Infect Immun **72**:5322-30.
 297. **Segura, M., J. Stankova, and M. Gottschalk.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. Infect. Immun. **67**:4646-4654.
 298. **Segura, M., N. Vadeboncoeur, and M. Gottschalk.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. Clin Exp Immunol **127**:243-54.
 299. **Segura, M., G. Vanier, D. Al-Numani, S. Lacouture, M. Olivier, and M. Gottschalk.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. FEMS Immunol Med Microbiol **47**:92-106.
 300. **Segura, M. A., P. Cleroux, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol **21**:189-95.
 301. **Seol, B., Z. Kelneric, D. Hajsig, J. Madic, and T. Naglic.** 1996. Susceptibility to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains isolated from pigs. Zentralbl Bakteriol **283**:328-31.
 302. **Serhir, B., D. Dubreuil, R. Higgins, and M. Jacques.** 1995. Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. J Bacteriol **177**:3830-6.

303. **Serhir, B., R. Higgins, B. Foiry, and M. Jacques.** 1993. Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*. *J Gen Microbiol* **139**:2953-8.
304. **Shiono, A., and Y. Ike.** 1999. Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells and inhibition of adhesion by fibronectin and trypsin treatment. *Infect Immun* **67**:1585-92.
305. **Sihvonen, L., D. N. Kurl, and J. Henrichsen.** 1988. *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. *Acta Vet Scand* **29**:9-13.
306. **Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann, and K. H. Krause.** 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell. Microbiol.* **1**:101-117.
307. **Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* **67**:1750-1756.
308. **Smith, H. E., R. de Vries, R. van't Slot, and M. A. Smits.** 2000. The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microb Pathog* **29**:127-34.
309. **Smith, H. E., F. H. Reek, U. Vecht, A. L. Gielkens, and M. A. Smits.** 1993. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infect. Immun.* **61**:3318-3326.
310. **Smith, H. E., M. Rijnsburger, N. Stockhofe-Zurwieden, H. J. Wisselink, U. Vecht, and M. A. Smits.** 1997. Virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile. *J. Clin. Microbiol* **35**:1049-1053.
311. **Smith, H. E., U. Vecht, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, Y. Biermann, and M. A. Smits.** 1996. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun* **64**:4409-12.
312. **Sokolova, O., N. Heppel, R. Jägerhuber, K. S. Kim, M. Frosch, M. Eigenthaler, and A. Schubert-Unkmeir.** 2004. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release. *Cell Microbiol.* **6**:1153-66.
313. **Spiss, H. K., M. Kofler, H. Hausdorfer, B. Pfausler, and E. Schmutzhard.** 1999. [*Streptococcus suis* meningitis and neurophysiology of the acoustic system. First case report from Austria]. *Nervenarzt* **70**:738-41.
314. **Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa.** 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* **21**:381-407.
315. **Stamatovic, S. M., P. Shakui, R. F. Keep, B. B. Moore, S. L. Kunkel, N. Van Rooijen, and A. V. Andjelkovic.** 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**:593-606.

316. **Standiford, T. J., D. A. Arenberg, J. M. Danforth, S. L. Kunkel, G. M. VanOtteren, and R. M. Strieter.** 1994. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun* **62**:119-25.
317. **Stanimirovic, D., and K. Satoh.** 2000. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* **10**:113-126.
318. **Staykova, M., L. Maxwell, and D. Willeborg.** 2000. Kinetics and polarization of the membrane expression of cytokine- induced ICAM-1 on rat brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**:120-128.
319. **Stins, M. F., F. Gilles, and K. S. Kim.** 1997. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* **76**:81-90.
320. **Stins, M. F., P. V. Nemani, C. Wass, and K. S. Kim.** 1999. *Escherichia coli* binding to and invasion of brain microvascular endothelial cells derived from humans and rats of different ages. *Infect Immun* **67**:5522-5.
321. **Strangmann, E., H. Froleke, and K. P. Kohse.** 2002. Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group. *Int J Hyg Environ Health* **205**:385-92.
322. **Strazielle, N., and J. F. Gherzi-Egea.** 2000. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**:561-574.
323. **Suankratay, C., P. Intalapaporn, P. Nunthapisud, K. Arunyingmongkol, and H. Wilde.** 2004. *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **35**:868-76.
324. **Swildens, B., M. Nielen, H. J. Wisselink, J. H. Verheijden, and J. A. Stegeman.** 2007. Elimination of strains of *Streptococcus suis* serotype 2 from the tonsils of carrier sows by combined medication and vaccination. *Vet Rec* **160**:619-21.
325. **Szczepanski, A., M. B. Furie, J. L. Benach, B. P. Lane, and H. B. Fleit.** 1990. Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium in vitro. *J Clin Invest* **85**:1637-47.
326. **Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki.** 2002. Evidence for lateral transfer of the Suilysin gene region of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **184**:2050-7.
327. **Takamatsu, D., M. Osaki, P. Tharavichitkul, S. Takai, and T. Sekizaki.** 2008. Allelic variation and prevalence of serum opacity factor among the *Streptococcus suis* population. *J Med Microbiol* **57**:488-94.
328. **Takamatsu, D., K. Wongsawan, M. Osaki, H. Nishino, T. Ishiji, P. Tharavichitkul, B. Khantawa, A. Fongcom, S. Takai, and T. Sekizaki.** 2008. *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis* **14**:181-3.
329. **Tambyah, P. A., G. Kumarasinghe, H. L. Chan, and K. O. Lee.** 1997. *Streptococcus suis* infection complicated by purpura fulminans and rhabdomyolysis: case report and review. *Clin Infect Dis* **24**:710-2.
330. **Tarradas, C., I. Luque, D. de Andres, Y. E. Abdel-Aziz Shahein, P. Pons, F. Gonzalez, C. Borge, and A. Perea.** 2001. Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**:347-55.
331. **Taylor, D. J.** 1986. *Pig diseases*, 4th ed. Burlington Press, Cambridge.

332. **Tayoro, J., J. M. Besnier, P. Laudat, B. Cattier, and P. Choutet.** 1996. Infective endocarditis due to *Streptococcus suis* serotype 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**:765-6.
333. **Telford, J. L., M. I. A. Barocchi, I. Margarit, R. Rappuoli, and G. Grandi.** 2006. Pili in gram-positive pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:509-519.
334. **Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggelpohler, D. Matalon, A. Seibt, G. E. K Novotny, H. J. Galla, and H. Schroten.** 2005. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:25-34.
335. **Tenenbaum, T., F. Essmann, R. Adam, A. Seibt, R. U. Janicke, G. E. Novotny, H. J. Galla, and H. Schroten.** 2006. Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection *in vitro*. *Brain Res* **1100**:1-12.
336. **Thanawongnuwech, R., G. B. Brown, P. G. Halbur, J. A. Roth, R. L. Royer, and B. J. Thacker.** 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet Pathol* **37**:143-52.
337. **Tian, Y., F. M. Aarestrup, and C. P. Lu.** 2004. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Vet Microbiol* **103**:55-62.
338. **Tikkanen, K., S. Haataja, and J. Finne.** 1996. The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infect Immun* **64**:3659-65.
339. **Tikkanen, K., S. Haataja, C. Francois-Gerard, and J. Finne.** 1995. Purification of a galactosyl-alpha 1-4-galactose-binding adhesin from the gram-positive meningitis-associated bacterium *Streptococcus suis*. *J Biol Chem* **270**:28874-8.
340. **Titball, R. W., A. Bell, and C. B. Munn.** 1985. Role of caseinase from *Aeromonas salmonicida* in activation of hemolysin. *Infect Immun* **49**:756-9.
341. **Torremorell, M., M. Calsamiglia, and C. Pijoan.** 1998. Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Can J Vet Res* **62**.
342. **Touil, F., R. Higgins, and M. Nadeau.** 1988. Isolation of *Streptococcus suis* from diseased pigs in Canada. *Vet Microbiol* **17**:171-7.
343. **Townsend, G. C., and W. M. Scheld.** 1995. Microbe-endothelium interactions in blood-brain barrier permeability during bacterial meningitis. *ASM News* **61**:294-298.
344. **Tsai, H. C., S. S. Lee, S. R. Wann, T. S. Huang, Y. S. Chen, and Y. C. Liu.** 2005. *Streptococcus suis* meningitis with ventriculoperitoneal shunt infection and spondylodiscitis. *J Formos Med Assoc* **104**:948-50.
345. **Tu, A. H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles, and A. J. Szalai.** 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**:4720-4.
346. **Tunkel, A. R., S. W. Rosser, E. J. Hansen, and W. M. Scheld.** 1991. Blood-brain barrier alterations in bacterial meningitis: development of an *in vitro* model and observations on the effects of lipopolysaccharide. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**:113-20.

347. **Twort, C. H.** 1981. Group R streptococcal meningitis (*Streptococcus suis* type II): a new industrial disease? Br Med J (Clin Res Ed) **282**:523-4.
348. **Ueno, M.** 2007. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. Curr Med Chem **14**:1199-2006.
349. **Ulloa, L., and K. J. Tracey.** 2005. The "cytokine profile": a code for sepsis. Trends Mol Med **11**:56-63.
350. **Unkmeir, A., K. Latsch, G. Dietrich, E. Wintermeyer, B. Schinke, S. Schwender, K. S. Kim, M. Eigenthaler, and M. Frosch.** 2002. Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. Mol Microbiol **46**:933-46.
351. **Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier, and M. Gottschalk.** 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **35**:49-58.
352. **Valentin-Weigand, P.** 2004. Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **117**:459-63.
353. **van der Flier, M., S. P. Geelen, J. L. Kimpfen, I. M. Hoepelman, and E. I. Tuomanen.** 2003. Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome? Clin Microbiol Rev:415-429.
354. **Vanier, G., A. Szczotka, P. Friedl, S. Lacouture, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 2006. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. Microbiology **152**:135-42.
355. **Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. Infect. Immun. **59**:3156-3162.
356. **Veiga, E., J. A. Guttman, M. Bonazzi, E. Boucrot, A. Toledo-Arana, A. E. Lin, J. Enninga, J. Pizarro-Cerda, B. B. Finlay, T. Kirchhausen, and P. Cossart.** 2007. Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. Cell Host Microbe **2**:340-51.
357. **Verma, S., R. Nakaoke, S. Dohgu, and W. A. Banks.** 2006. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. Brain Behav Immun **20**:449-55.
358. **Vilaichone, R. K., V. Mahachai, and P. Nunthapisud.** 2000. *Streptococcus suis* peritonitis: case report. J Med Assoc Thai **83**:1274-7.
359. **Vilaichone, R. K., W. Vilaichone, P. Nunthapisud, and H. Wilde.** 2002. *Streptococcus suis* infection in Thailand. J Med Assoc Thai **85** Suppl 1:S109-17.
360. **Virji, M., H. Kayhty, D. J. Ferguson, C. Alexandrescu, and E. R. Moxon.** 1991. Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. Microb. Pathog. **10**:231-245.
361. **Voutsadakis, I. A.** 2006. *Streptococcus suis* endocarditis and colon carcinoma: a case report. Clin Colorectal Cancer **6**:226-8.
362. **Wang, K., and C. Lu.** 2007. Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **120**:207-9.
363. **Wang, W., W. L. Dentler, and R. T. Borchardt.** 2001. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**:H434-H440.

364. **Watkins, E. J., P. Brooksby, M. S. Schweiger, and S. M. Enright.** 2001. Septicaemia in a pig-farm worker. *Lancet* **357**:38.
365. **Wibawan, I. W., and C. Lammler.** 1994. Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. *Zentralbl Veterinarmed [B]* **41**:453-9.
366. **Willenburg, K. S., D. E. Sentochnik, and R. N. Zadoks.** 2006. Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N Engl J Med* **354**:1325.
367. **Williams, A. E.** 1990. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb Pathog* **8**:189-96.
368. **Williams, A. E., and W. F. Blakemore.** 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* **162**:474-81.
369. **Williams, A. E., and W. F. Blakemore.** 1990. Pathology of Streptococcal meningitis following intravenous intracisternal and natural routes of infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* **16**:345-56.
370. **Williams, A. E., W. F. Blankemore, and T. J. L. Alexander.** 1988. A murine model of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *Res Vet Sci* **45**.
371. **Williams, D. M., G. H. Lawson, and A. C. Rowland.** 1973. Streptococcal infection in piglets: the palatine tonsils as portals of entry for *Streptococcus suis*. *Res Vet Sci* **15**:352-62.
372. **Wilson, S. L., and D. A. Drevets.** 1998. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **178**:1658-1666.
373. **Wilson, S. M., P. Norton, K. Haverson, J. Leigh, and M. Bailey.** 2007. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Vet Immunol Immunopathol* **117**:116-23.
374. **Wilson, T. L., J. Jeffers, V. J. Rapp-Gabrielson, S. Martin, L. K. Klein, D. E. Lowery, and T. E. Fuller.** 2007. A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **122**:135-45.
375. **Windsor, R. S., and S. D. Elliott.** 1975. Streptococcal infection in young pigs IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *J Hyg (Lond)* **75**:69-78.
376. **Winterhoff, N., R. Goethe, P. Gruening, M. Rohde, H. Kalisz, H. E. Smith, and P. Valentin-Weigand.** 2002. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the Arginine Deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **184**:6768-76.
377. **Wispelwey, B., A. J. Lesse, E. J. Hansen, and W. M. Scheld.** 1988. *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability during experimental meningitis in the rat. *J Clin Invest* **82**:1339-46.
378. **Wisselink, H. J., H. E. Smith, N. Stockhofe-Zurwieden, K. Peperkamp, and U. Vecht.** 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* **74**:237-48.
379. **Wisselink, H. J., N. Stockhofe-Zurwieden, L. A. Hilgers, and H. E. Smith.** 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on

- a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. Vet Microbiol **84**:155-68.
380. **Wisselink, H. J., U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden, and H. E. Smith.** 2001. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. Vet Rec **148**:473-7.
 381. **Wong, D., R. Prameya, and K. Dorovini-Zis.** 2007. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. J Neuroimmunol **184**:136-48.
 382. **Woo, J.** 1986. *Streptococcus suis* meningitis in man in Hong Kong. Trans R Soc Trop Med Hyg **80**:848-9.
 383. **Woo, J., and E. K. Li.** 1987. *Streptococcus suis* meningitis requires prolonged treatment with penicillin. Infection **15**:129-30.
 384. **Xie, Y., K. J. Kim, and K. S. Kim.** 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. FEMS Immunol Med Microbiol **42**:271-9.
 385. **Yamaguchi, M., Y. Terao, T. Ogawa, T. Takahashi, S. Hamada, and S. Kawabata.** 2006. Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. Microbes Infect **8**:2791-6.
 386. **Ye, C., X. Zhu, H. Jing, H. Du, M. Segura, H. Zheng, B. Kan, L. Wang, X. Bai, Y. Zhou, Z. Cui, S. Zhang, D. Jin, N. Sun, X. Luo, J. Zhang, Z. Gong, X. Wang, L. Wang, H. Sun, Z. Li, Q. Sun, H. Liu, B. Dong, C. Ke, H. Yuan, H. Wang, K. Tian, Y. Wang, M. Gottschalk, and J. Xu.** 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. Emerg Infect Dis **12**:1203-8.
 387. **Yen, M. Y., Y. C. Liu, J. H. Wang, Y. S. Chen, Y. H. Wang, and D. L. Cheng.** 1994. *Streptococcus suis* meningitis complicated with permanent perceptive deafness: report of a case. Journal of the Formosan Medical Association **93**:349-351.
 388. **Yu, H., H. Jing, Z. Chen, H. Zheng, X. Zhu, H. Wang, S. Wang, L. Liu, R. Zu, L. Luo, N. Xiang, H. Liu, X. Liu, Y. Shu, S. S. Lee, S. K. Chuang, Y. Wang, J. Xu, and W. Yang.** 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. Emerg Infect Dis **12**:914-20.
 389. **Zou, Y., L. He, F. Chi, A. Jong, and S. H. Huang.** 2007. Involvement of *Escherichia coli* K1 *ibeT* in bacterial adhesion that is associated with the entry into human brain microvascular endothelial cells. Med Microbiol Immunol doi:10.1007/s00430-007-0065-y.
 390. **Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck, and H. P. Heinz.** 2001. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. **69**:845-852.

VII. ANNEXES

Use of Selective Capture of Transcribed Sequences To Identify Genes Preferentially Expressed by *Streptococcus suis* upon Interaction with Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells[▼]

Nahuel Fittipaldi,^{1,2} Marcelo Gottschalk,^{1,2} Ghyslaine Vanier,^{1,2} France Daigle,^{1,3} and Josée Harel^{1,2*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine¹ and Faculté de Médecine Vétérinaire,² Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada, and Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada³

Received 31 January 2007/Accepted 29 April 2007

By using the selective capture of transcribed sequences (SCOTS) approach, we identified 28 genes preferentially expressed by the major swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. Several of these genes may be considered new *S. suis* candidate virulence factors. Results from this study demonstrate the suitability of SCOTS for the elucidation of gene expression in streptococcal species and may contribute to a better understanding of the pathogenesis of *S. suis* infections.

Streptococcus suis is a gram-positive bacterium responsible for, among other diseases, meningitis and septicemia in swine (14). *S. suis* is also a zoonotic agent. Many cases of human *S. suis* infection have been reported in different Asian and European countries, as well as in New Zealand, Australia, Argentina, and Canada (25). Very recently, the first case of human meningitis caused by *S. suis* was recorded in the United States (43). Indeed, *S. suis* is increasingly becoming a public health concern. For instance, during a recent outbreak in China more than 200 cases of human *S. suis* infection were reported, 39 of which resulted in death (33, 45). Despite increasing research in recent years, knowledge of the pathogenesis of *S. suis* infection remains limited (11, 14). Only the capsular polysaccharide and a recently described serum opacity-like factor have been shown to play a critical role in the pathogenesis of the infection (3, 14). Proposed putative virulence factors such as the suilysin, the extracellular protein factor, and the muramidase-released protein, although associated with virulence, have been found to be nonessential factors (6, 14). Other determinants, such as a fibronectin/fibrinogen-binding protein, were found to be partially involved in virulence (6, 14), while the actual roles of some other virulence candidates (e.g., the cell wall and several putative adhesins and proteases) in the pathogenesis of *S. suis* infection remain to be verified (11, 14).

S. suis needs to attain the central nervous system (CNS) in order to cause meningitis in swine. It has been suggested that this pathogen might reach the CNS by crossing the porcine blood-brain barrier (BBB) by transcytosis through porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC) and/or porcine choroid plexus epithelial cells, as well as by disruption of the barrier caused by toxic effects on BBB-forming cells (11, 36). Support for these mechanisms has been provided by re-

cent studies showing that *S. suis* is able to affect the viability of porcine choroid plexus epithelial cells through necrotic and apoptotic mechanisms (37) and to adhere to and invade in vitro-cultured PBMEC (38). However, little is known about the molecular means by which *S. suis* accomplishes these processes.

Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) is a PCR-based RNA analysis method that offers several advantages in comparison to other genomic approaches, such as in vivo expression technology (IVET) or signature-tagged mutagenesis (29). In fact, SCOTS directly identifies bacterial genes rather than promoter regions and is not confounded by polar effects when genes are arranged in polycistronic operons (29). The SCOTS approach has been used with success in many gram-negative bacteria, as well as in *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes* (5, 10, 13, 22). In this work, we used the SCOTS approach to identify genes preferentially expressed by *S. suis* during its interactions with cells of the BBB, a process that might be essential for the pathogenesis of the meningitis caused by this pathogen.

Experimental model and bacterial transcriptome recovery. *S. suis* serotype 2 highly virulent strain 31533 (38) and the PBMEC line PBMEC/C1-2 (34) were used in this study. PBMEC were grown in Primaria six-well tissue culture plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with IF culture medium (a 1:1 mixture of Iscove's modified Dulbecco's and Ham's F-12 media; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) as previously described (38). *S. suis* was grown in Todd-Hewitt broth (Becton Dickinson, Sparks, MD) for 16 h at 37°C, harvested by centrifugation, washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.3), and resuspended in fresh IF culture medium at 10⁶ CFU/ml. Confluent monolayers of PBMEC (at 3 × 10⁶ cells per well) were inoculated with 3 ml of this bacterial suspension (multiplicity of infection = 1). Plates were centrifuged at 800 × g for 10 min and incubated for 4 h at 37°C with 5% CO₂. After incubation, actual *S. suis* adhesion to and invasion of PBMEC were verified in selected wells and found to be in agreement with reported values (38; data not shown). For identification of

* Corresponding author. Mailing address: GREMIP, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada. Phone: [REDACTED]

[▼] Published ahead of print on 4 May 2007.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
ARO-A-F	AACGTGACCTACCTCCGTTG
ARO-A-R	CGGTCATCGTAGAATTCGAGT
CELL-RNA	ACACTCTCGAGACATACCGGTACCN NNNNNNNN
MOCK-RNA	CTTAGCCACTACGTGCGGATCCAGAC NNNNNNNNNN
RDNA-F	GGCTCAGGACGAACGCTG
RDNA-R	GCTAAGCGACTACCGTATCT
MOCK-PCR	CTTAGCCACTACGTGCGGATCCAGAC
CELL-PCR	GACACTCTCGAGACATACCGGTACC
RPOD-F	TCTTTCAAATACATGCGGACTG
RPOD-R	ATTCCATTTACGCTTGATGCTG
SSU0424-F	AATCAAAGATTGGACGAGCC
SSU0424-R	CAATCCATCCCAATTCAGACAG
SSU0870-F	GGTATCATGAATACGGACGAAG
SSU0870-R	GAATGGATGGGCAATGAGAG
SSU0067-F	ATCAATCATCAAGGGATGCG
SSU0067-R	GATAGCCACCTCTTTTTCCAC
SSU1448-FQ	TTCTCTCTGTACTTGCTCCC
SSU1448-RQ	GGTCGCTCTAACCTTTTGATG
SSU0457-F	ACCAGATAGCCACTATTCC
SSU0457-R	CTGATCATAAGTGAAGTCGCG
SSU0597-F	TGCGTCTGGTTAAGACTTTG
SSU0597-R	GTCTTGCCAGCTTTTTTTC

the genes transcribed during interaction, total RNA from *S. suis*-infected PBMEC cells was prepared from 24 independent P6 wells with RNAwiz (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from *S. suis* grown under the same conditions but without cells (mock infection) was prepared from five P6 wells. Samples were treated with TURBO DNase (Ambion), and absence of contaminating DNA was verified by PCR with primers AROA-F and BA9 (Table 1), which target the *aroA* gene. RNA was quantified by measurement of absorbance at 260 nm, and its integrity was verified by visualization on 1% denaturing agarose gels.

Selective capture of transcribed sequences. Five micrograms of total RNA prepared from both infected and mock-infected samples was reverse transcribed by random priming with SuperScript II (Invitrogen). Primer CELL-RNA or MOCK-RNA, with a defined terminal sequence at the 5' end and a random nonamer at the 3' end, was used (Table 1). Thereafter, cDNA sequences corresponding to bacterial mRNAs were selectively captured from the mixture of total PBMEC-*S. suis* RNAs or total *S. suis* RNAs by performing three rounds of SCOTS as previously described (5). Briefly, samples were normalized by self-hybridization and then hybridized overnight at 68°C to biotinylated genomic *S. suis* 31533 DNA that had previously been blocked with PCR-generated DNA representing 16S and 23S *S. suis* rRNA sequences (primers RDNA-F and RDNA-R, Table 1). Bacterial cDNAs were then separated with streptavidin-coupled magnetic beads. After elution, cDNAs were PCR reamplified with primer CELL-PCR or MOCK PCR (Table 1), which corresponds to the defined sequence added during reverse transcription and is specific to each condition. Sequences preferentially transcribed by *S. suis* upon interaction with PBMEC were obtained after three rounds of enrichment carried out as previously described (5). Briefly, cDNAs obtained during PBMEC interaction were subjected to the procedure outlined above, but this time the bio-

tinylated genomic *S. suis* DNA used for capture had previously been prehybridized with DNA sequences corresponding to 16S and 23S *S. suis* rRNAs and cDNAs from the mock infection. The resulting interaction-specific cDNAs were cloned into vector pCR4 (TOPO TA cloning kit; Invitrogen) and sequenced. DNA sequences were determined at the DNA Sequencing Facility of the University of Maine (Orono) on a 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Identification of preferentially expressed genes. The BLAST software package was used to determine sequence homologies in the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequence comparison was also performed against sequence data produced by the *S. suis* Sequencing Group at the Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis) for European strain P1/7 and at the Joint Genome Institute Microbial Genomics website (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=stisu&advanced=1>) for North American strain 89-1591. We report here the identification, by SCOTS, of 28 genes as being preferentially expressed by *S. suis* upon interaction with PBMEC. These genes can be divided into the following eight functional groups: metabolism/housekeeping, cell envelope, secreted proteases, cell division/replication, regulatory, protein sorting- and transport/binding-related genes, and genes with unknown function. To the best of our knowledge, none of the identified genes has ever before been associated with the pathogenesis of *S. suis* infection. Similar to other studies of host-pathogen interaction (2, 5, 31), most of the genes identified by SCOTS in this study are putatively involved in metabolic/housekeeping functions and do not encode "genuine" virulence factors. However, identification of these genes may be of importance, since new information about the metabolism of *S. suis* is rendered that may eventually prove useful for vaccine development. On the other hand, some genes identified by SCOTS in this study are known to be important for the virulence of other gram-positive bacteria (including at least three different streptococcal species). The relevance of these genes will be discussed below. For all of the other genes identified in this study, putative functions and references to publications describing their in vivo expression and/or involvement in virulence in other organisms are listed in Table 2.

Validation of SCOTS results by q-PCR. The SCOTS approach, as used in this study, should result in the identification of genes that are upregulated by *S. suis* upon interaction with PBMEC (5). Therefore, to validate our SCOTS results, we used quantitative PCR (q-PCR) to measure the level of expression of random selected genes on a new series of infection replicates. Infection of PBMEC, mock infections, and RNA extraction from both samples were performed as described above. cDNAs were synthesized in triplicate by using SuperScript II with random hexamers (Roche, Laval, Quebec, Canada). q-PCR was performed by using the QuantiTect SybrGreen PCR kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. For each sample, a no-reverse transcription reaction was run as a control. The primers used are described in Table 1. For each q-PCR run, the calculated threshold cycle (C_T) was normalized to the C_T of the internal control *rpoD* gene amplified from the corresponding sample, and the n -fold change was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method as previously described (23). Results of q-PCR analysis

TABLE 2. Genes identified by SCOTS that are differentially expressed by *S. suis* upon interaction with PBMEC

Function and clone	Gene ^a	Putative function (organism)	GenBank identification	Reference(s)
Metabolism/housekeeping				
D3C3	ssu0707	Putative exonuclease RxB (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00874950	24
2H6	ssu0767	1-Phosphofructokinase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875124	
2G7	ssu1411	Aminotransferase, classes I and II (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875661	
D3G2	ssu1527	Aminodeoxychorismate lyase-like protein (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00876086	12
1B7	ssu1444	Uridine kinase (<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066)	AAV_62804	
D1B7	ssu0844	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00874652	
1G10	ssu1044	Ribonucleoside diphosphate reductase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875241	
D1H10	ssu1159	Ribosome recycling factor (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875081	
1C7	ssu0870	Nucleotidyltransferase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00874394	
2F10	ssu0871	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00874395	
1A11	ssu0764	tRNA (guanine-N1-)-methyltransferase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875121	
Cell envelope				
2A11	ssu0597	Membrane-bound O-acyl transferase, DltB (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875261	12
2A8	ssu1184	D-Alanine-D-alanine ligase (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875052	18
1H9	ssu1448	Peptidoglycan polysaccharide deacetylase PgdA (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00876135	40, 41
1E9	ssu1487	VanZ-like protein (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875572	12
D1G11	ssu1114	Glycosyltransferase, group 1 (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875224	
Regulatory				
D2D4	ssu0869	Putative transcriptional regulator, LysR family (<i>S. pneumoniae</i> TIGR4)	AAK74821	
Protein sorting				
1C11	ssu0424	Signal peptidases S24, S26A, and S26B (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875273	29
1B8	ssu0453	Sortase-like protein SrtE (<i>S. suis</i>)	BAB83972	
Secreted protease				
D1E9	ssu0457	Collagenase-peptidase U32 (<i>S. suis</i>)	BAB83975	
Cell division/replication				
1G5	ssu0007	DNA polymerase III, β chain (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875475	12
2F4	ssu0432	Cell division protein FtsQ/DivIB (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00876117	
Transport/binding				
D1H3	ssu1787	Multidrug ABC transporter, ATP-binding protein (<i>B. cereus</i> E33L)	AAU18528	
D3G1	ssu1023	Putative permease (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00874974	
Unknown function				
D1G1	ssu0067	Protein of unknown function DUF925 (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00876271	
2F6	ssu1424	Hypothetical protein (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875489	
D1H2	ssu0858	Protein of unknown function UPF0153 (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00875788	
D1A3	ssu1792	Conserved hypothetical protein (<i>S. suis</i> 89/1591)	ZP_00876058	

^a Genes are named in accordance with the *S. suis* strain P1/7 sequencing project nomenclature.

for these selected genes showed that they were indeed upregulated by *S. suis* upon interaction with PBMEC (Fig. 1), with changes ranging from 2.18- to 10-fold. The gene *aroA*, which is known to be expressed in equal amounts under both conditions (our unpublished results), was also used.

Genes involved in cell envelope modification. As stated above, some genes identified by SCOTS might be considered, on the basis of their functions in other organisms, potential *S. suis* candidate virulence factors. For instance, the ssu0597 gene (*dltB*) belongs to an operon comprising four genes, *dltA*, *dltB*, *dltC*, and *dltD*, which is present in all of the genomes of low-G+C bacteria determined so far (28). In all of the species where this operon has been studied, all four of the genes are required to catalyze the incorporation of D-alanine residues into the lipoteichoic acids (LTAs). D-Alanylation of LTAs allows gram-positive bacteria to modulate their surface charge, to regulate ligand binding, and to control the electromechan-

ical properties of the cell wall (28). In addition, formation of D-alanyl-LTAs is required to resist the action of antimicrobial peptides in *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (group A *Streptococcus*), and *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus* [GBS]) (1, 20, 21, 30, 42). Besides, the virulence of mutants deficient in D-alanylation of LTAs of GBS, *L. monocytogenes*, or *S. aureus* was severely impaired in the murine or rabbit model of infection (1, 30, 42). The D-alanylation of *S. suis* LTAs has not been documented. However, it is known that wild-type *S. suis* LTAs are important for adhesion of this bacterium to PBMEC. Indeed, inhibition of the adhesion of *S. suis* to this cell type can be obtained by preincubation of PBMEC with purified LTA (39). From our SCOTS results, it might be hypothesized that *S. suis* might be able to modulate the degree of D-alanylation of its LTAs by upregulation of its *dlt* operon upon interaction with PBMEC. Further studies focusing on

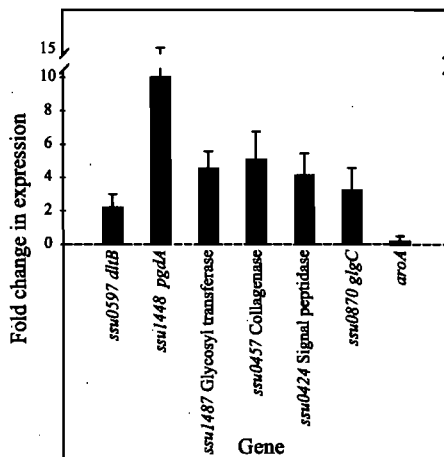


FIG. 1. n -Fold changes in the expression of selected *S. suis* genes identified by SCOTS as measured by q-PCR upon interaction of the bacterium with PBMEC. See the text for details.

this operon of *S. suis* are under way to evaluate this hypothesis. However, it is interesting that in some gram-positive pathogens it has been shown that D-alanyl-LTAs contribute to adhesion to and invasion of various cell lines and that these steps may depend on a high ratio of D-alanine to glycerol/ribitol phosphate in their LTAs (1, 21, 30, 42).

The main clinical feature of *S. suis* is meningitis, and this bacterium is often isolated from the cerebrospinal fluid of animals or patients with meningitis (14). On the other hand, it has been reported that patients suffering from meningitis present increased titers of lysozyme in their cerebrospinal fluid (19). As shown in this study, *S. suis* differentially expresses a gene (ssu1448) highly homologous to *S. pneumoniae* *pgdA*, which encodes a peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase. Peptidoglycan is an essential component of the bacterial cell wall and an important target for the innate immune system. Peptidoglycan modification by deacetylation seems to be important for gram-positive pathogens. Indeed, pneumococci in which *pgdA* was inactivated became hypersensitive to the action of lysozyme (41) and showed reduced virulence in a

murine model of infection (40). In addition, it has very recently been reported that a *pgdA* mutant strain of *L. monocytogenes* was impaired in the ability to induce disease in the murine model of infection and that the *pgdA* gene was required by this species to resist the host innate immune response mediated by lysozyme (4). In this regard, it may be of interest to further evaluate the hypothesis that *S. suis*, through the action of the *pgdA* gene product, has the ability to modify its peptidoglycan by deacetylation and therefore resist a host innate response mediated by this enzyme. On the other hand, it is intriguing that in our in vitro model, where the immune response of the host would not be as relevant as in the in vivo situation, the *pgdA* gene was found to be highly upregulated. However, it has been proposed that, in vivo, *S. suis* might gain access to the CNS by transcytosis across PBMEC (38). It might therefore be plausible that during its interaction with PBMEC, in addition to genes required for adhesion to and invasion of these cells, *S. suis* also upregulates genes required for the steps immediately following the BBB crossing. Further studies are required to evaluate this hypothesis.

Identification of a putative pilus island in *S. suis*. Pili in several gram-positive bacteria have recently been described, and it has been proposed that they may play an important role in virulence (35). For instance, in GBS, pili participate in adhesion to human epithelial cells (7) and their role in adhesion to extracellular matrix (ECM) proteins has been suggested (27). In this work, we identified a gene (ssu0424) putatively encoding a signal peptidase homologous to the LepB-type signal peptidases of gram-negative bacteria. A homologous LepB-type signal peptidase is the first gene in GBS pilus island 2b (PI-2b), one of the three identified pilus islands in this species (35). GBS PI-2b contains five other downstream genes, encoding two LPXTG proteins (suggested to be an ancillary protein and the main pilus subunit), a class C sortase, a third LPXTG protein (ancillary protein), and a second class C sortase (35) (Fig. 2). The presence of thin, pilus-like structures on the surface of *S. suis* has been revealed by electron microscopy (15). Interestingly, analysis of data from the two *S. suis* sequencing projects strongly suggests that *S. suis* possesses a truncated version of this pilus island. In fact, in sequenced *S.*

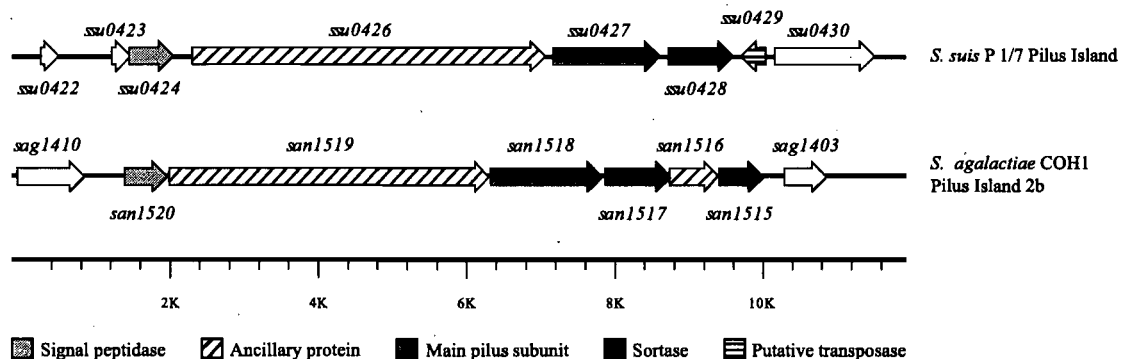


FIG. 2. Putative pilus island in *S. suis* (top) and its counterpart, PI-2b, found in *S. agalactiae* strain COH1 (bottom). In *S. suis*, the first gene of the locus is a LepB-type signal peptidase (identified by SCOTS and q-PCR as upregulated upon interaction with PBMEC), which is followed downstream by the genes for a putative ancillary protein and a main pilus subunit. A previously undescribed class C sortase is encoded by the last gene of the island. *S. agalactiae* PI-2b, which is organized in a similar way, comprises an additional ancillary pilus subunit and a second class C sortase (GenBank entry NZ_AAJR0100022).

suis strains P1/7 and 89-1591, two genes encoding LPXTG proteins (highly homologous to the ancillary and main pilus subunits of GBS, respectively) and a gene encoding an undescribed putative class C sortase-like protein are found downstream of the LepB signal peptidase that was identified by SCOTS (Fig. 2). Although the *S. suis* putative pilus island lacks the last two genes in comparison to that of GBS, the similarity in genetic organization, the strong homology showed by the LPXTG proteins to the main and ancillary pilus proteins of the latter species, and the current proposed mechanism for pilus formation in gram-positive bacteria (7, 27) suggest that a pilus might be formed by the gene products of this island. In addition, we speculate that this pilus might participate in *S. suis* adhesion to or invasion of PBMEC. In fact, pili have been very recently shown to be important for GBS adhesion to and invasion of human BMEC (26). Although functional analysis of this *S. suis* putative pilus island is needed to fully evaluate this hypothesis, it is interesting that the LepB signal peptidase was found to be highly upregulated by q-PCR (fourfold change) upon interaction of *S. suis* with PBMEC (Fig. 1).

Additionally, in this study we identified the *ssu0453* gene, which was previously named *srtE* and encodes one of the four class C sortases already described in *S. suis* (8, 29). In GBS and group A *Streptococcus* models of pilus assembly, class C sortases have been proposed to catalyze the covalent polymerization of the pilin subunits encoded by genes within the pilus island bearing the class C sortases (7, 27). However, previous work with *S. suis* (29), as well as analysis of sequenced strains P1/7 and 89-1591, indicates that the *S. suis* *srtE* gene is not flanked by genes encoding LPXTG proteins and thus does not seem to be part of a pilus island. Therefore, the putative participation of *S. suis* *ssu0453/srtE* in pilus formation following the proposed model is unlikely. However, it might be interesting to evaluate whether this sortase is required for, or contributes to, the assembly of pilin subunits encoded by the island described in this work or by other, as yet unidentified, islands.

Interaction of *S. suis* with ECM proteins. It has been shown that *S. suis* is able to interact with ECM proteins (9). *S. suis* also has the ability to degrade ECM proteins through the upregulation of metalloproteinase 9 production by human macrophages (16), which may result in tissue destruction and BBB disruption. However, the ability of *S. suis* to degrade ECM proteins directly has not been demonstrated. Interestingly, one of the genes identified by SCOTS (*ssu0457*) encodes a putative collagenase which, in sequenced strains P1/7 and 89-1591, is located upstream of a gene that putatively encodes a second collagenase, in an operon-like organization. It has been suggested that the impairment of BBB function during infection with different *S. suis* strains may depend on proteases produced by this pathogen (17). It is thus tempting to speculate, even if we lack evidence regarding its exact function, that upregulating the expression of the collagenase identified in this work upon interaction with PBMEC might, in vivo, be useful to increase the permeability of the BBB and therefore contribute to the migration of *S. suis* to the CNS.

Suitability of the SCOTS approach for elucidation of gene expression in *S. suis*. The SCOTS approach has been used successfully with several bacterial species (5, 10, 13, 22). To the best of our knowledge, this is the first report of its use with a

streptococcal species. Results presented here clearly demonstrate that SCOTS is also suitable for the elucidation of gene expression in streptococci and particularly in organisms like *S. suis*, for which very few molecular tools exist. Indeed, with the exception of the present study, only one genomic approach has been used to study this pathogen (32). In that work, an adapted IVET approach identified several *S. suis* iron-induced and/or in vivo (porcine infection model)-expressed genes (32). However, all of the genes identified in that study were also expressed in vitro under standard laboratory growth conditions. These results can be explained by the absence of promoter sequences exclusively expressed under the conditions tested (32). However, since a plasmid-based system was used instead of an integrative promoter trap system, the results obtained might also be explained by the inability of that system to detect in vitro silent genes because of gene dose effects (32). On the other hand, with SCOTS we clearly showed condition-specific differences in *S. suis* gene expression. In fact, SCOTS may be considered the only approach available for the direct study of global differential gene expression in *S. suis*. Despite the fact that IVET and SCOTS have identified the same genes in some cases (31), there were no overlapping genes in the IVET and SCOTS *S. suis* studies. This was not surprising, however, since only a small number of genes were identified in either study and, more importantly, the experimental conditions used were essentially different. Therefore, in this study, the use of the SCOTS approach resulted in original insights into the molecular mechanisms that this pathogen might use to cross the BBB. Indeed, the identification of the 28 genes preferentially expressed upon interaction of *S. suis* with PBMEC, several of which show great potential as virulence factors, may result in a better understanding of how this pathogen causes meningitis. In addition, extending the SCOTS analysis to identify transcriptional differences at different in vivo locations (i.e., brain, heart, tonsils), as well as at different stages of infection, may lead to comprehension of the mechanisms of disease progression and provide clues to prevention.

Addendum. While this work was under revision, an article was published (44) describing the use of the signature-tagged mutagenesis approach to study genes important for the virulence of *S. suis* in a pig model of infection. The *ssu0457* gene reported in the present article was also found in that study.

We are grateful to T. Sekizaki for critical reading of the manuscript. We thank P. Friedl for kindly providing the PBMEC/C1-2 cell line. We also thank D. Tremblay, S. Faucher, and M. Lamarche for helpful suggestions and M. Esgleas for assistance.

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 0680154280 and by the Canadian Research Network on Swine Infectious Diseases. N.F. and G.V. are holders of NSERC postgraduate scholarships.

REFERENCES

1. Abachin, E., C. Poyart, E. Pellegrini, E. Milohanic, F. Fiedler, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. 2002. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 43:1–14.
2. Autret, N., and A. Charbit. 2005. Lessons from signature-tagged mutagenesis on the infectious mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:703–717.
3. Baums, C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand. 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 74:6154–6162.

4. Boneca, I. G., O. Dussurget, D. Cabanes, M.-A. Nahori, S. Sousa, M. Lecuit, E. Psyllinakis, V. Bouriotis, J.-P. Hugot, M. Giovannini, A. Coyle, J. Bertin, A. Namane, J.-C. Rousselle, N. Cayet, M.-C. Prevost, V. Balloy, M. Chignard, D. J. Philpott, P. Cossart, and S. E. Girardin. 2007. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:997–1002.
5. Daigle, F., J. Y. Hou, and J. E. Clark-Curtiss. 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Methods Enzymol.* 358:108–122.
6. de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith. 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* 70:1319–1325.
7. Dramsi, S., E. Callot, I. Bonne, S. Guadagnini, M. C. Prevost, M. Kojadinovic, L. Lalioui, C. Poyart, and P. Trieu-Cuot. 2006. Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* 60:1401–1413.
8. Dramsi, S., P. Trieu-Cuot, and H. Bierne. 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of gram-positive bacteria. *Res. Microbiol.* 156:289–297.
9. Esgleas, M., S. Lacouture, and M. Gottschalk. 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 244:33–40.
10. Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle. 2006. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:1906–1911.
11. Gottschalk, M., and M. Segura. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol.* 76:259–272.
12. Hava, D. L., and A. Camilli. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45:1389–1406.
13. Haydel, S. E., and J. E. Clark-Curtiss. 2006. The *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator represses transcription of the intracellularly expressed Rv1057 gene, encoding a seven-bladed β -propeller. *J. Bacteriol.* 188:150–159.
14. Higgins, R., and M. Gottschalk. 2005. Streptococcal diseases, p. 769–783. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames.
15. Jacques, M., M. Gottschalk, B. Foiry, and R. Higgins. 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* 172:2833–2838.
16. Jobin, M.-C., M. Gottschalk, and D. Grenier. 2006. Upregulation of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase 9 production by human macrophage-like cells: synergistic effect of capsular material and cell wall from *Streptococcus suis*. *Microb. Pathog.* 40:29–34.
17. Jobin, M. C., and D. Grenier. 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 220:113–119.
18. Jones, A. L., K. M. Knoll, and C. E. Rubens. 2000. Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 37:1444–1455.
19. Klockars, M., S. Reitamo, T. Weber, and Y. Kerttula. 1978. Cerebrospinal fluid lysozyme in bacterial and viral meningitis. *Acta Med. Scand.* 203:71–74.
20. Kovács, M., A. Halfmann, I. Fedtke, M. Heintz, A. Peschel, W. Vollmer, R. Hakenbeck, and R. Bruckner. 2006. A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188:5797–5805.
21. Kristian, S. A., V. Datta, C. Weidenmaier, R. Kansal, I. Fedtke, A. Peschel, R. L. Gallo, and V. Nizet. 2005. D-Alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J. Bacteriol.* 187:6719–6725.
22. Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse II, and B. J. Wilkinson. 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1697–1705.
23. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402.
24. Loo, C. Y., K. Mitrakul, I. B. Voss, C. V. Hughes, and N. Ganeshkumar. 2003. Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 185:6241–6254.
25. Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu. 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect. Dis.* 7:201–209.
26. Maissey, H. C., M. Hensler, V. Nizet, and K. S. Doran. 2007. Group B streptococcal pili proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.* 189:1464–1467.
27. Mora, M., G. Bensi, S. Capo, F. Falugi, C. Zingaretti, A. G. Manetti, T. Maggi, A. R. Taddei, G. Grandi, and J. L. Telford. 2005. Group A *Streptococcus* produce pili-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15641–15646.
28. Neuhaus, F. C., and J. Baddiley. 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:686–723.
29. Osaki, M., D. Takamatsu, Y. Shimoji, and T. Sekizaki. 2002. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 184:971–982.
30. Poyart, C., E. Pellegrini, M. Marceau, M. Baptista, F. Jaubert, M.-C. Lamy, and P. Trieu-Cuot. 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* 49:1615–1625.
31. Rediers, H., P. B. Rainey, J. Vanderleyden, and R. De Mot. 2005. Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:217–261.
32. Smith, H. E., H. Buijs, R. de Vries, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits. 2001. Environmentally regulated genes of *Streptococcus suis*: identification by the use of iron-restricted conditions in vitro and by experimental infection of piglets. *Microbiology* 147:271–280.
33. Sriskandan, S., and J. D. Slater. 2006. Invasive disease and toxic shock due to zoonotic *Streptococcus suis*: an emerging infection in the East? *PLoS Med.* 3:e187.
34. Teifel, M., and P. Friedl. 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp. Cell Res.* 228:50.
35. Telford, J. L., M. I. A. Barocchi, I. Margarit, R. Rappuoli, and G. Grandi. 2006. Pili in gram-positive pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:509–519.
36. Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggelpohler, D. Matalon, A. Seibt, K. N. GE, H. J. Galla, and H. Schroten. 2005. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44:25–34.
37. Tenenbaum, T., F. Essmann, R. Adam, A. Seibt, R. U. Janicke, G. E. Novotny, H. J. Galla, and H. Schroten. 2006. Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. *Brain Res.* 1100:1–12.
38. Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk. 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* 72:1441–1449.
39. Vanier, G., M. Segura, and M. Gottschalk. 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Can. J. Vet. Res.* 71:81–89.
40. Vollmer, W., and A. Tomasz. 2002. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 70:7176–7178.
41. Vollmer, W., and A. Tomasz. 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 275:20496–20501.
42. Weidenmaier, C., A. Peschel, V. A. J. Kempf, N. Lucindo, M. R. Yeaman, and A. S. Bayer. 2005. DltABCD- and MprF-mediated cell envelope modifications of *Staphylococcus aureus* confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. *Infect. Immun.* 73:8033–8038.
43. Willenburg, K. S., D. E. Sentochnik, and R. N. Zadoks. 2006. Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *N. Engl. J. Med.* 354:1325.
44. Wilson, T. L., J. Jeffers, V. J. Rapp-Gabrielson, S. Martin, L. K. Klein, D. E. Lowery, and T. E. Fuller. 2007. A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet. Microbiol.* 122:135–145.
45. Yu, H., H. Jing, Z. Chen, H. Zheng, X. Zhu, H. Wang, S. Wang, L. Liu, R. Zu, L. Luo, N. Xiang, H. Liu, X. Liu, Y. Shu, S. S. Lee, S. K. Chuang, Y. Wang, J. Xu, and W. Yang. 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 12:914–920.

Haemophilus parasuis invades porcine brain microvascular endothelial cells

Ghyslaine Vanier,¹ Anna Szczotka,² Peter Friedl,³ Sonia Lacouture,¹ Mario Jacques^{1,2} and Marcelo Gottschalk^{1,2}

Correspondence
Marcelo Gottschalk
marcelo.gottschalk@umontreal.ca

^{1,2}Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP)¹ and Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine², Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada

³Institute für Biochemie, Technische Hochschule Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany

Haemophilus parasuis, an important swine pathogen, is the aetiological agent of Glässer's disease. It is responsible for cases of polyserositis, meningitis and pneumonia in young pigs. To date, 15 serotypes have been described, although several non-typable isolates are frequently recovered from diseased animals. The pathogenesis of *H. parasuis* infection is poorly understood. To cause meningitis, *H. parasuis* would have to cross the blood–brain barrier (BBB), composed of brain microvascular endothelial cells (BMEC). The objective of this study was to investigate the ability of *H. parasuis* to interact with porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC). It was demonstrated that the serotype 5 reference strain of *H. parasuis*, Nagasaki (originally recovered from a case of meningitis), was able to adhere at very high levels to and, most importantly, invade PBMEC. These capacities were confirmed by electron microscopy. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 (strain WF 83), used as negative control, was not able to adhere to or invade PBMEC. Comparisons of the levels of adhesion and invasion by several *H. parasuis* field strains from different serotypes isolated from cases of either meningitis or pneumonia showed that isolates of serotypes 4 and 5 had a higher invasion capacity than isolates belonging to other serotypes. Inhibition studies demonstrated that PBMEC invasion by *H. parasuis* required rearrangement of actin microfilaments and microtubular cytoskeletal elements but not active bacterial DNA, RNA or protein synthesis. Characterization studies demonstrated that proteinaceous invasins does not seem to play a major role in entry of *H. parasuis* into PBMEC. Intracellular viable *H. parasuis* were found in PBMEC up to 6 h after antibiotic treatment. Even at high bacterial doses, *H. parasuis* was not toxic to PBMEC. In swine, the invasion of endothelial cells of the BBB may play an important role in the pathogenesis of meningitis caused by *H. parasuis*.

Received 30 June 2005
Revised 7 September 2005
Accepted 4 October 2005

INTRODUCTION

Haemophilus parasuis, an important swine pathogen, is the aetiological agent of Glässer's disease. It is responsible for cases of polyserositis, meningitis and pneumonia in young pigs (Amano *et al.*, 1994). To date, 15 serotypes have been described using an immunodiffusion test with heat-stable antigens (Kielstein *et al.*, 1991; Morozumi & Nicolet, 1986a;

Rapp-Gabrielson & Gabrielson, 1992), although several non-typable isolates are frequently recovered from diseased animals (Rafiee & Blackall, 2000). Recently, the use of the indirect haemagglutination test has been proposed by two studies in which less than 10 % of non-typable strains were reported (Del Rio *et al.*, 2003; Tadjine *et al.*, 2004). However, Turni & Blackall (2005) recommended the use of an indirect haemagglutination test only as a complement of the gel diffusion test in the case of a non-typable result or cross-reaction. In North America, serotypes 4 and 5 are the most frequently isolated (Rapp-Gabrielson & Gabrielson, 1992; Tadjine *et al.*, 2004).

Virulence factors involved in *H. parasuis* infection are still unknown. The association of either capsule expression or whole-cell protein profiles with virulence of *H. parasuis* is

Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; BMEC, brain microvascular endothelial cells; CNS, central nervous system; LDH, lactate dehydrogenase; LOS, lipooligosaccharides; LPS, lipopolysaccharides; PBMEC, porcine brain microvascular endothelial cells; pPBMEC, primary porcine brain microvascular endothelial cells; PPLO, pleuropneumonia-like organisms; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy.

controversial (Oliveira & Pijoan, 2004). In addition, virulent and non-virulent strains share similar patterns of lipooligosaccharides (LOS) (Zucker *et al.*, 1996) and the presence of fimbriae-like structures has been observed after *in vivo* passage (Munch *et al.*, 1992). Finally, a neuraminidase activity has been described as a putative virulence factor (Lichtensteiger & Vimr, 1997). It is hypothesized that this enzyme, in concert with permease and aldolase, may contribute to bacterial virulence by scavenging carbohydrates from host cells. However, the actual role of this enzyme in the persistence or virulence of *H. parasuis* has yet to be demonstrated. More recently, differential-display RT-PCR has been used to search for genes associated with virulence (Hill *et al.*, 2003). Although some interesting candidate genes were found, no single virulence factor was clearly identified. It remains unclear if there is a relationship between the virulence of isolates and the serotype (Kielstein *et al.*, 1991; Morozumi & Nicolet, 1986a, b; Rapp-Gabrielson & Gabrielson, 1992). However, it is generally acceptable to use serotype as a marker of pathogenicity (Oliveira & Pijoan, 2004). In this way, serotypes 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14 and 15 are considered to be virulent while the other serotypes are thought to be avirulent (Amano *et al.*, 1994; Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992).

The pathogenesis of *H. parasuis* infection is poorly understood. The bacteria normally colonize the upper respiratory tract of pigs, which constitute their natural reservoir (Moller & Kilian, 1990). Virulent strains of *H. parasuis* are able to breach the mucosal barrier and get into the bloodstream (Vahle *et al.*, 1997). *In vivo* studies indicated that bacteria were not closely apposed to cilia or other cell structures (Vahle *et al.*, 1997). However, no studies on the specific interactions between *H. parasuis* and host epithelial and/or endothelial cells have been performed.

Factors involved in systemic invasion by *H. parasuis* are unknown. To cause meningitis, *H. parasuis* has to reach the central nervous system (CNS). One way by which bacteria could gain access to CNS is to cross the blood-brain barrier (BBB). The BBB, an anatomically and functionally unique barrier, separates the CNS from the bloodstream and is responsible for maintaining homeostasis within the CNS. The BBB is formed, in part, by the endothelium lining the brain capillaries. This endothelium is composed of brain microvascular endothelial cells (BMEC) that form tight junctions regulating the traffic of solutes, macromolecules and cells across the BBB (Huang *et al.*, 2000; Tuomanen, 1996). These microvessels are covered by pericytes and outgrowths of astrocytes (called astrocytic end-feet) (Goldstein & Betz, 1986; Kniesel & Wolburg, 2000). The primary site of breakdown of the BBB in most cases of bacterial meningitis appears to be the BMEC (Townsend & Scheld, 1995). However, it is not clear how circulating *H. parasuis* crosses the BBB.

To further understand the pathogenesis of *H. parasuis*-induced meningitis in swine, the objective of this study was

to investigate the capacity of *H. parasuis* to interact with porcine brain microvascular endothelial cells (PBMEC).

METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The *H. parasuis* serotype 5 reference strain Nagasaki, isolated from a case of septicaemia with meningitis (Morozumi & Nicolet, 1986b) and kindly provided by Dr R. F. Ross (Iowa State University), served as the reference strain. Other *H. parasuis* strains used in this study are listed in Table 1. Bacteria were grown for 48 h on PPLO agar plates (Difco) at 37 °C, and isolated colonies were inoculated in PPLO broth (Difco) for 8 h at 37 °C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 µl of a 10⁻³ dilution of these cultures in 30 ml PPLO broth for 16 h at 37 °C with agitation. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.3), and were appropriately diluted in cell culture medium before infection (see Results). An accurate determination of the number of c.f.u. per ml in the final suspension was made by plating onto PPLO agar supplemented with glucose (0.1%, w/v) and β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD; 0.004%, w/v; Sigma). In addition, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 reference strain WF 83 was used as a negative control. *A. pleuropneumoniae*, which causes swine pleuropneumonia, is very rarely found in the blood circulation and is not known to cause meningitis (Gottschalk & Taylor, 2005).

Cell culture. The porcine brain microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 (Teifel & Friedl, 1996) was cultivated as previously described (Vanier *et al.*, 2004). Briefly, cells were grown in complete

Table 1. Strains used in this study

Strain	Serotype	Pathology	Provided by†
Nagasaki*	5	Meningitis	R. F. Ross
KBQ N1Br	5	Meningitis	C. Pijoan
KBQ WBr1	5	Meningitis	C. Pijoan
Pig 9-Y	4	Meningitis	C. Pijoan
34/6 156	4	Meningitis	C. Pijoan
46252-Y	2	Meningitis	C. Pijoan
35594 Bre-Y	1	Meningitis	C. Pijoan
Pig 11-Y	12	Meningitis	C. Pijoan
Pig 27 (4 weeks in)-Y	12	Meningitis	C. Pijoan
03-2402 A	7	Meningitis	C. Pijoan
03-001198-Y	7	Meningitis	C. Pijoan
STF 04-0507-2	5	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 04-0348	4	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 03-6521-2	4	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 04-0116	4	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 03-6681	2	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 03-6562	2	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 03-6369-1	4	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 03-6900	7	Pneumonia	K. R. Mittal
STF 03-7961	12	Pneumonia	K. R. Mittal
SHY 03-4432	13	Pneumonia	K. R. Mittal

*Reference strain used in this study.

†R. F. Ross, Iowa State University; C. Pijoan, University of Minnesota; K. R. Mittal, Université de Montréal.

IF medium, which is a mixture of 1:1 Iscove's modified Dulbecco's medium and Ham's F-12 (Invitrogen) supplemented with 7.5% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum (hiFBS), penicillin-streptomycin (Invitrogen), sodium bicarbonate, L-glutamine, human transferrin (MP Biomedicals), N-acetylcysteine, hypoxanthine, porcine heparin, human recombinant fibroblast growth factor-basic (Sigma), and β -mercaptoethanol (Bio-Rad). Flasks (Falcon; Becton Dickinson) and Primaria 24-well tissue culture plates (Falcon) were precoated with 1% (w/v) type A gelatin from porcine skin (Sigma) to support the cells. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ in a humid atmosphere and used before the 20th passage for all experiments. Primary porcine brain microvascular endothelial cells (pPBMEC) were purchased from Cell Systems and were grown according to the supplier's recommendations. For assays, PBMEC and pPBMEC were trypsinized and diluted in their culture medium at 1×10^5 cells ml⁻¹. The cell suspension was distributed in tissue culture plates and incubated to confluence. Immediately before the experiments, medium was removed from the plates and replaced by the respective medium without antibiotics.

PBMEC adhesion and invasion assays. The adhesion assay to quantify total cell-associated (intracellular plus surface-adhered) bacteria was performed as previously described (Vanier *et al.*, 2004), with some modifications. Briefly, bacteria were pelleted, washed twice with PBS, and resuspended in fresh cell culture medium without antibiotics at 10^7 c.f.u. ml⁻¹. Confluent monolayers of PBMEC grown in 24-well plates were infected with 1 ml aliquots of bacterial suspension. The plates were incubated for different times up to 2 h at 37 °C to allow bacterial adhesion. Thereafter, cells were vigorously washed five times with PBS to eliminate non-specific bacterial attachment and incubated for 10 min at 37 °C in the presence of 200 μ l 0.05% trypsin/0.03% EDTA. After this incubation period, 800 μ l ice-cold deionized water was added, and cells were disrupted by scraping the bottom of the well and by repeated pipetting to liberate cell-associated bacteria. Serial dilutions of this cell lysate were plated onto PPLO agar and incubated for 48 h at 37 °C. Levels of adhesion are expressed as the total number of c.f.u. recovered per well.

The invasion assay to quantify intracellular bacteria was performed in a similar manner to the adhesion assay, but the plates were centrifuged at 800 g for 10 min to bring bacteria to the surface of the monolayer and incubated for different times up to 4 h. The monolayers were then washed four times with PBS; 1 ml cell culture medium containing 100 μ g gentamicin ml⁻¹ and 5 μ g penicillin G ml⁻¹ (Sigma) was added to each well, and the plates were incubated for 2 h at 37 °C to kill extracellular and surface-adhered bacteria. The monolayers were washed three times with PBS before incubation with 0.05% trypsin/0.03% EDTA. Controls using a bacterial concentration similar to the resulting concentration of surface-adhered bacteria were performed to ensure that the antibiotic concentrations used were sufficient to kill all extracellular cell-associated bacteria after 2 h of treatment. Adhesion and invasion assays were performed under non-toxic conditions (see below). For the intracellular survival assay, an invasion assay was performed as described above except that after a 2 h invasion period, the initial gentamicin/penicillin G treatment was lengthened for different times up to an additional 6 h. Data are expressed as the total number of recovered c.f.u. per well after antibiotic treatment.

Invasion inhibition studies. For experiments testing the effects of inhibitors of bacterial DNA, RNA and protein synthesis, bacteria were pre-treated with ciprofloxacin (Bayer), rifampicin (Sigma) or tetracycline (Sigma), respectively. *H. parasuis* strain Nagasaki (10^7 c.f.u. ml⁻¹) was treated with the appropriate concentration of inhibitor at 37 °C for 30 min prior to infection, as well as during the 2 h invasion period. Respective MICs (determined according to NCCLS recommendations) for strain Nagasaki were

<0.125 μ g ml⁻¹ for ciprofloxacin, 0.125 μ g ml⁻¹ for rifampicin and 0.25 μ g ml⁻¹ for tetracycline. In addition to MICs, concentrations corresponding to one-half and twice the MICs were also used for each antibiotic. Results are expressed as percentage invasion relative to the invasion level without inhibitor (taken as 100% invasion).

To study the effect of proteases affecting outer-surface proteins, *H. parasuis* strain Nagasaki was treated with proteinase K (Roche) at 0.1–2 mg ml⁻¹ for 1 h at 37 °C, washed twice in PBS, resuspended in culture medium, and used to infect PBMEC for 2 h.

For experiments testing the effects of inhibitors of the formation of microfilaments and microtubules, PBMEC monolayers were preincubated with cytochalasin D or colchicine (Sigma), respectively. Different concentrations of the inhibitors were added at 37 °C for 30 min prior to the infection with strain Nagasaki, as well as during the 2 h invasion period. Cytochalasin D concentrations of 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 μ g ml⁻¹ and colchicine concentrations of 1.0, 5.0, 10 and 20 μ g ml⁻¹ were used. Results are expressed as percentage invasion relative to invasion level without inhibitor (taken as 100% invasion).

PBMEC cytotoxicity assay. The cytotoxic effect of bacteria was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) measurement. Briefly, bacteria were grown and diluted as described above and confluent monolayers of PBMEC grown in 24-well plates were infected with 1 ml aliquots of bacterial suspension. The plates were centrifuged at 800 g for 10 min to bring bacteria to the surface of the monolayer. The plates were incubated at 37 °C for different times up to 18 h. Non-infected cells and bacteria in IF medium without a PBMEC monolayer were used as negative controls, whereas cells lysed in 0.025% Triton X-100 were used as a positive control (100% toxicity). At the end of the incubation period, a 100 μ l aliquot of each supernatant was transferred to a 96-well plate, which was centrifuged at 250 g for 5 min. LDH measurement was performed on 50 μ l aliquots of each centrifuged supernatant using the CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega).

Electron microscopy studies. For transmission electron microscopy (TEM), PBMEC cell monolayers were grown on 13 mm Thermanox coverslips in a 24-well culture plate. Adhesion and invasion assays were performed as described above. After two washes with PBS, the monolayers were fixed for 1 h at room temperature with 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.3 and then samples were postfixed in 2% (v/v) osmium tetroxide in deionized water. Specimens were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in Spurr resin. Thin sections were cut with a diamond knife on a Leica Ultracut ultramicrotome and post-stained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed with a model 420 electron microscope (Philips Electronics). For scanning electron microscopy (SEM), samples were processed as for the TEM, except that they were not postfixed with osmium tetroxide. Samples for SEM were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and covered with gold after critical-point drying and examined using a Hitachi S-3000N microscope.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm standard deviations (error bars). Data were analysed by two-tailed, unpaired *t* test. For comparison of adhesion and invasion capacities of several *H. parasuis* strains, a linear mixed model followed by Tukey–Kramer post hoc test were used. A *P* value of <0.05 was considered significant. All assays were repeated at least three times in independent experiments.

RESULTS

High bacterial doses of *H. parasuis* are not toxic to PBMEC

To determine whether *H. parasuis* is cytotoxic to PBMEC, LDH release measurements were performed. During the 18 h incubation period, less than 2% cytotoxicity was observed with strain Nagasaki even at a high concentration of 10^8 c.f.u. ml^{-1} . Based on these results, the bacterial concentration used for the 2 h invasion assay (10^7 c.f.u. ml^{-1}) described above was not deemed to be toxic to the cells. *A. pleuropneumoniae* strain WF 83 gave a good positive control, since it exhibited $22\% \pm 5\%$ toxicity after 4 h of incubation and toxicity increased considerably after 6 h of incubation, to reach $88\% \pm 14\%$. As was the case for *H. parasuis*, conditions used for adhesion/invasion assays with this strain were not cytotoxic.

H. parasuis adhesion to PBMEC

H. parasuis was able to adhere to PBMEC at high levels. This adhesion was time-dependent (Fig. 1a) and reached a plateau after 30 min incubation. The time-dependent adhesion kinetics was not due to an increase in the number of c.f.u. since *H. parasuis* did not grow during the 2 h incubation period used for adhesion assay (data not shown). Also, adhesion was dependent on the concentration of bacteria (Fig. 1b). *A. pleuropneumoniae* strain WF 83 was

used as negative control for the adhesion assays and no bacteria were recovered throughout the 2 h invasion period (Fig. 1a).

PBMEC invasion by *H. parasuis*

H. parasuis was able to invade PBMEC and this invasion capacity depended on incubation time (Fig. 2a) and bacterial concentration (Fig. 2b). No significant increase in invasion was observed after 1 h incubation ($P > 0.05$). *A. pleuropneumoniae* strain WF 83 was used as a negative control for the invasion assays and no bacteria were recovered throughout the 4 h invasion period (Fig. 2a).

To confirm that *H. parasuis* adhesion to and invasion of PBMEC was not due to cell immortalization, primary PBMEC were used. Similar levels of adhesion and invasion were observed between pPBMEC and immortalized PBMEC (data not shown).

Confirmation of adhesion and invasion by electron microscopy

TEM and SEM were used to confirm adhesion and invasion. After 15 min incubation, bacteria were observed to adhere to PBMEC (Fig. 3a). Fig. 3(b) shows *H. parasuis* bacteria in close contact with a cell and within an invagination.

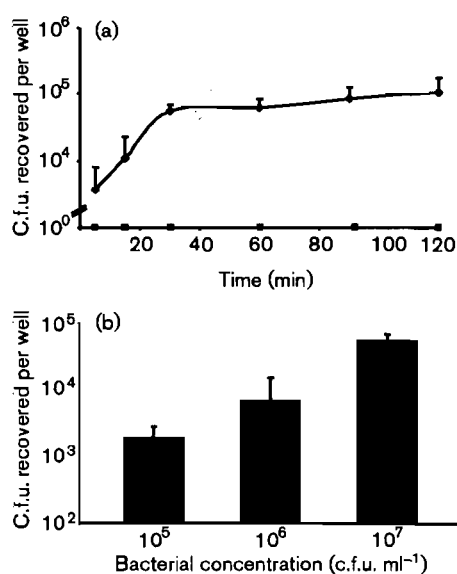


Fig. 1. (a) Kinetics of *H. parasuis* adhesion to PBMEC. PBMEC were exposed to *H. parasuis* (◆) or *A. pleuropneumoniae* (■) for the indicated times and then washed extensively to remove nonadherent bacteria. Cell lysates were plated onto PPLO agar to obtain bacterial viable plate counts as described in Methods. (b) Effect of *H. parasuis* concentration on level of adhesion to PBMEC after 30 min using the protocol described above.

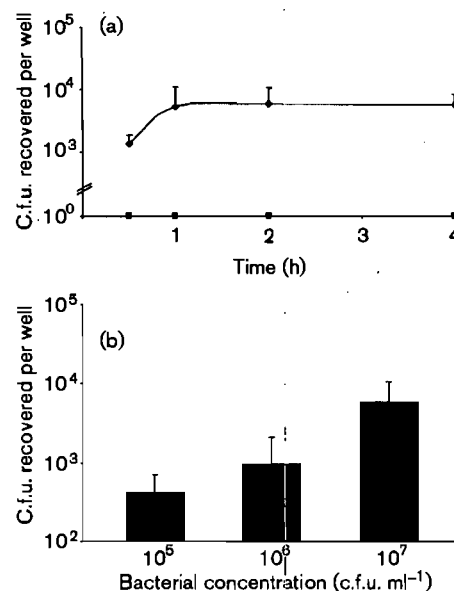


Fig. 2. (a) Kinetics of PBMEC invasion by *H. parasuis*. PBMEC were exposed to *H. parasuis* (◆) or *A. pleuropneumoniae* (■), then washed extensively to remove nonadherent bacteria and treated with antibiotics to kill extracellular bacteria, followed by further washing and lysis of the PBMEC. Cell lysates were plated onto PPLO agar to obtain bacterial viable plate counts as described in Methods. (b) Effect of *H. parasuis* concentration on level of PBMEC invasion after 2 h using the protocol described above.

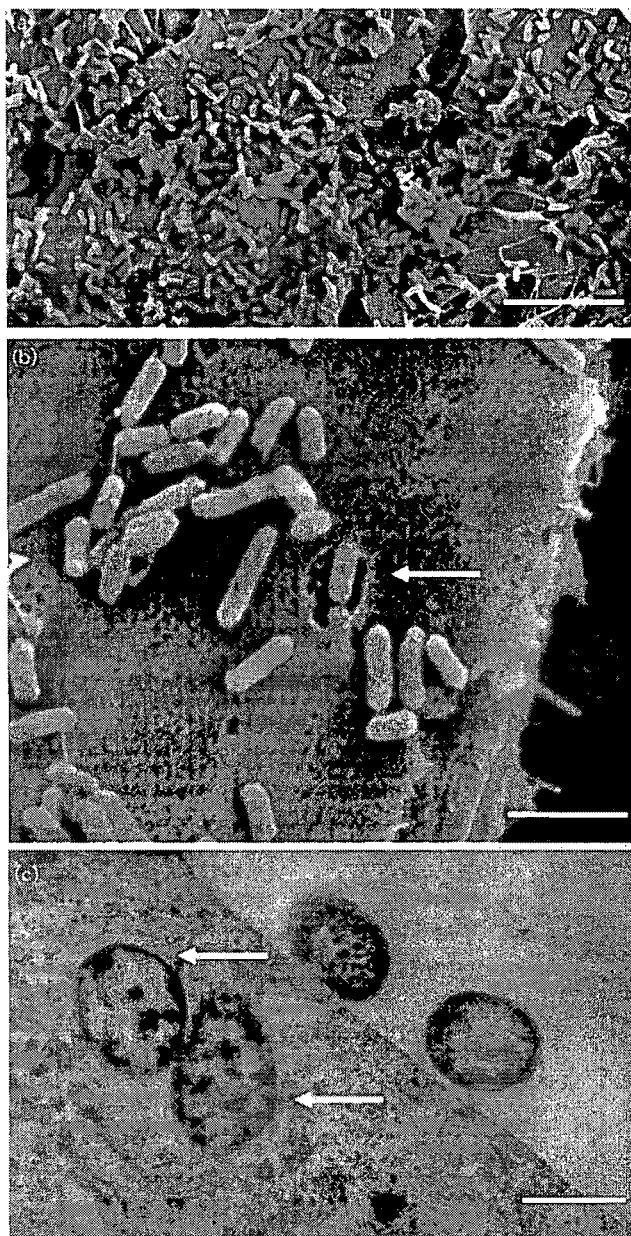


Fig. 3. SEM (a, b) and TEM (c) micrographs showing *H. parasuis* interactions with PBMEC after 15 min (a, b) and 2 h (c) incubation. The arrows indicate invading *H. parasuis*. Bars: 8 μ m (a), 2 μ m (b), 0.5 μ m (c).

Fig. 3(c) provides evidence confirming the intracellular invasion of PBMEC by *H. parasuis*.

***H. parasuis* intracellular survival within PBMEC**

As shown in Fig. 4, after an initial 2 h invasion period and a minimal 2 h treatment with antibiotics, viable *H. parasuis* strain Nagasaki were found inside PBMEC up to an additional 6 h of incubation in the presence of antibiotics to exclude any extracellular source of bacteria. The results

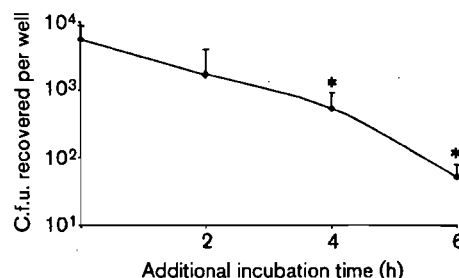


Fig. 4. Intracellular survival of *H. parasuis* (10^7 c.f.u. ml⁻¹) within PBMEC. Additional incubation time represents time after the standard 2 h antibiotic treatment of the invasion assay. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) between the number of intracellular bacteria recovered per well obtained at the additional incubation time and the number obtained after the initial 2 h antibiotic treatment (time 0 h).

showed a gradual decrease in the number of viable intracellular bacteria, which is significant ($P < 0.05$) after 4 h of incubation with antibiotics.

Comparison of adhesion and invasion capacities of several field *H. parasuis* strains

Several field *H. parasuis* strains were compared for their ability to adhere to and invade PBMEC according to their serotype and the pathology (meningitis or pneumonia) observed in the infected pigs from which they were originally isolated. Our results showed that the ability of *H. parasuis* to adhere to and invade PBMEC was observed not only with the reference strain Nagasaki but also with most of the field strains tested. Although individual differences were observed in levels of adhesion and invasion among the strains, no correlation was found with the pathology (meningitis or pneumonia) caused by the strains (data not shown). On the other hand, the mean capacity to adhere to PBMEC was similar among all serotypes (1, 2, 4, 5, 7, 12 and 13) tested ($P > 0.05$; data not shown). However, differences in mean invasion levels were observed among serotypes. Although only a few strains of some serotypes were tested, strains of serotypes 4 and 5 exhibited a higher invasion capacity than strains belonging to other serotypes (data not shown). If the mean invasion result for serotype 5 is considered as 100 %, mean invasion results are 130 %, 34 %, 14 %, 9 %, 9 % and 0.2 % for serotypes 4, 2, 7, 1, 12 and 13, respectively.

Characterization of PBMEC invasion by *H. parasuis*

To evaluate the possible role of bacterial DNA, RNA and protein synthesis in invasion of PBMEC by *H. parasuis*, bacteria were pre-treated with ciprofloxacin, rifampicin or tetracycline. When used at their respective MICs, none of these antibiotics was able to inhibit PBMEC invasion by *H. parasuis* strain Nagasaki (data not shown). Similar levels of

invasion were observed using concentrations corresponding to one-half and twice the MICs for all antibiotics (data not shown).

To determine whether bacterial proteins play a role in the invasion of PBMEC, bacteria were pretreated with proteinase K at a maximal concentration of 2 mg ml^{-1} that did not exert any effect on the viability of the bacteria (data not shown). The treatment did not affect invasion, as demonstrated by the similar level of invasion ($94\% \pm 22\%$) by treated bacteria as that by non-treated bacteria (taken as 100%). Parallel studies using an invasive strain of *Streptococcus suis* showed that the proteinase K treatment was effective since it significantly affected the invasion capacity of this bacterial species (data not shown).

To evaluate the possible role of microfilaments and microtubules in invasion of PBMEC by *H. parasuis*, cells were pre-treated with cytochalasin D or colchicine, respectively. As shown in Fig. 5, both cytochalasin D and colchicine inhibited the invasion of PBMEC by *H. parasuis* strain Nagasaki. A cytochalasin D concentration of $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ inhibited more than 80% of invasion ($P < 0.05$), while $20 \mu\text{g}$ colchicine ml^{-1} was able to inhibit more than 70% of invasion ($P < 0.05$). None of the products used as eukaryotic inhibitors of PBMEC invasion was shown to be toxic to the PBMEC or bacteria at the concentrations used (data not shown).

DISCUSSION

Although *H. parasuis* is one of the most important swine pathogens worldwide, very little is known about the virulence factors or markers. In addition, there are currently no vaccines available that effectively protect animals against the infection. However, a study by Oliveira *et al.* (2001) showed that experimental inoculation of 5-day-old piglets with a live systemic strain of *H. parasuis* may be more effective

in reducing morbidity and mortality than the colonization of piglets by nose-to-nose contact with inoculated sows. The pathogenesis of *H. parasuis* infection is also poorly understood. Increasing our understanding of the mechanisms by which these bacteria cause disease may help advance the development of effective tools to control the infection.

Of the many clinical diseases arising from *H. parasuis* infection, meningitis is one of the most frequently observed complications. To enter the CNS and cause disease, circulating *H. parasuis* has to first resist phagocytosis in order to remain at high concentrations in the bloodstream. In the only study published to date, Segales *et al.* (1998) reported that *H. parasuis* is able to resist phagocytosis by alveolar macrophages. In fact, the notion that a capsular polysaccharide is involved in protecting bacteria from phagocytosis is still controversial (Oliveira & Pijoan, 2004). Once in the bloodstream, bacteria must be able to cross the BBB in order to reach the CNS and cause meningitis. Since BMEC are the most important components of the BBB, in this study we investigated the interactions between *H. parasuis* and PBMEC.

High numbers of *H. parasuis* were observed to adhere to PBMEC in a time-dependent manner. This finding is in agreement with the time-dependent adhesion of *Streptococcus suis*, another swine meningeal pathogen, to PBMEC (Vanier *et al.*, 2004). However, *H. parasuis* appears to possess a considerably higher capacity than *S. suis* to adhere to these cells. Indeed, adhesion to PBMEC by *H. parasuis* reached a plateau (at 30 min; this study) more rapidly than the adhesion by *S. suis* (at 4 to 6 h; Vanier *et al.*, 2004). In contrast to the experiments with *S. suis*, results in this study were obtained without spinning down bacteria to facilitate contact with PBMEC. In fact, almost 100% adhesion was obtained immediately when *H. parasuis* was spun down with the cells (unpublished observations). The high capacity of *H. parasuis* to adhere to PBMEC was also observed by electron microscopy.

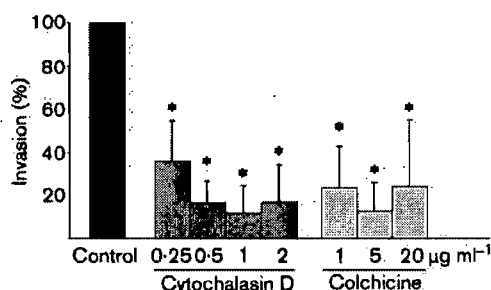


Fig. 5. Inhibition of invasion of PBMEC by *H. parasuis* strain Nagasaki (10^7 c.f.u. ml^{-1}) with cytochalasin D and colchicine. PBMEC monolayers were preincubated with the indicated concentrations of inhibitors at 37°C for 30 min prior to infection as well as during the 2 h invasion period. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) in comparison with the level of invasion without inhibitor (taken as 100%).

In addition to adhesion, this study demonstrated that *H. parasuis* is also able to invade PBMEC. To the best of our knowledge, this is the first report on *H. parasuis* invasion of endothelial cells. Invasion of PBMEC was confirmed by SEM and TEM. Invasion of BMEC by free bacteria has also been reported for other Gram-negative meningeal pathogens, such as *Haemophilus influenzae* (Daines *et al.*, 2003), *Escherichia coli* K1 (Badger & Kim, 1998) and *Citrobacter freundii* (Badger *et al.*, 1999). Our results showed that binding to and entry of *H. parasuis* into PBMEC were not due to immortalization of PBMEC since *H. parasuis* was able to invade primary PBMEC at levels similar to those observed with immortalized cells. Interestingly, *A. pleuropneumoniae*, a respiratory pathogen that does not cause systemic disease, was unable to adhere to or invade either type of cells.

Results in this study suggest that active bacterial DNA, RNA and protein synthesis may not be required by *H. parasuis* to invade PBMEC. These findings are consistent with those

reported by Virji *et al.* (1991) on HUVEC invasion by *Haemophilus influenzae*. Thus, the entry of the bacterium may be mediated by pre-existing putative invasin(s) interacting with a cell receptor (Huang & Jong, 2001; Townsend & Scheld, 1995). In addition, proteinaceous invasin(s) does not seem to play a major role in *H. parasuis* invasion. However, the possibility that some surface proteins that might also contribute to the invasion process could have been restored after the 2 h incubation period of invasion can not completely be ruled out. It may be hypothesized that other non-proteinaceous surface components, such as LOS, could play an important role in *H. parasuis* adhesion and entry into PBMEC. LPS from *A. pleuropneumoniae* were shown to be involved in adherence to porcine respiratory tract cells (Belanger *et al.*, 1990; Jacques *et al.*, 1991). Studies on the possible role of LOS in the interactions between *H. parasuis* and endothelial cells are warranted.

Reorganization of host cytoskeleton components, namely actin microfilaments and microtubules, was observed to be required for entry of *H. parasuis* into PBMEC. In agreement with our findings, the invasion of Chang epithelial cells by *H. influenzae* (St Geme & Falkow, 1990) and of bovine aortic endothelial cells by *Pasteurella multocida* (Galdiero *et al.*, 2001) was found to be dependent on microfilament and microtubule formation. Thus, internalization of other members of the family *Pasteurellaceae* may involve similar microfilament and microtubule reorganizations.

It has been suggested that many invading pathogens enter endothelial cells as a transient process (Hippenstiel & Suttorp, 2003). This is likely to be the case for *H. parasuis* since the intracellular bacteria survive inside PBMEC but their number decreases gradually with time. It can be hypothesized that *H. parasuis* undergoes exocytosis after invasion as described for other pathogens, such as *P. multocida* with bovine aortic cells (Galdiero *et al.*, 2001). However, degraded *H. parasuis* bacteria were exceptionally observed inside PBMEC by TEM (data not shown), indicating that the decreasing number of live intracellular bacteria could also be due in part to bacterial death. *In vitro* BBB models should be used to confirm the proposed hypothesis.

Cell adherence and subsequent entry of the bacteria into PBMEC were not associated with pathology caused by the strains. A previous study by Rapp-Gabrielson *et al.* (1992) showed that following an intraperitoneal inoculation, *H. parasuis* strains of serotypes 2, 3 and 5 could be isolated from nearly all cultured tissues, including brain and lungs. Although no differences were observed in levels of adhesion, strains of serotypes 4 and 5 exhibited a higher level of invasion than strains of other serotypes. Interestingly, serotypes 4 and 5 are the most prevalent types isolated from diseased pigs in North America (Rapp-Gabrielson & Gabrielson, 1992). However, since only a few strains of some serotypes were used in this study, conclusions are limited. A study including a large number of strains from all known serotypes would confirm this hypothesis.

It has been previously suggested that *H. parasuis* is able to damage the mucosal epithelium and induce inflammation through the release of one or more toxic compounds (Vahle *et al.*, 1997). Interestingly, *H. parasuis* does not possess Apx toxin genes, in contrast to other members of the family *Pasteurellaceae* such as *A. pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis* (Schaller *et al.*, 2000). However, direct studies on the toxic effect of *H. parasuis* on host cells have not been performed thus far. In the present study, using a highly sensitive test, *H. parasuis* exerted no detectable toxic activity toward PBMEC even though it was expected that high concentrations of LOS from *H. parasuis* would be toxic to the cells. It has been shown that whole cells and LPS from *H. influenzae* are able to disrupt a monolayer of bovine BMEC (Patrick *et al.*, 1992). However, this toxic activity appears to be specific to the origin of the cells since another study, using rat BMEC, showed an increase of albumin permeability of the BBB in the absence of cell death as assessed by LDH release (Tunkel *et al.*, 1991). Similarly, a possible role of *H. parasuis* and/or its LOS in potentially increasing permeability of BBB with swine cells cannot be ruled out. In fact, a role of endotoxin in the pathogenicity of *H. parasuis* in acute septicemia in pigs has been reported (Amano *et al.*, 1997). Cell toxicity observed with *A. pleuropneumoniae* serotype 7 after prolonged incubation was probably due to the presence of ApxII toxin (Choi *et al.*, 2001).

In conclusion, this study is the first to describe a high capacity of *H. parasuis* to adhere to and invade PBMEC. Further studies are needed to characterize the molecule(s) that mediate the adherence to and/or invasion of PBMEC. In swine, the entry of *H. parasuis* into endothelial cells constituting the BBB may be a key step in the pathogenesis of meningitis caused by this pathogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Meunier-Côté for technical assistance. We also acknowledge D. Montpetit from the Centre de Recherche et Développement sur les Aliments (CRDA) for the transmission and scanning electron microscopy. We are indebted to Dr K. R. Mittal and Dr C. Pijoan for providing some of the strains used in this study. This work was supported by the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine (CRNBPS) and the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) grant no. PR-106088. G. V. is recipient of an NSERC scholarship.

REFERENCES

- Amano, H., Shibata, M., Kajio, N. & Morozumi, T. (1994). Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J Vet Med Sci* 56, 639–644.
- Amano, H., Shibata, M., Takahashi, K. & Sasaki, Y. (1997). Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. *J Vet Med Sci* 59, 451–455.
- Badger, J. L. & Kim, K. S. (1998). Environmental growth conditions influence the ability of *Escherichia coli* K1 to invade brain microvascular endothelial cells and confer serum resistance. *Infect Immun* 66, 5692–5697.

- Badger, J. L., Stins, M. F. & Kim, K. S. (1999). *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 67, 4208–4215.
- Belanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C. & Jacques, M. (1990). Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* 58, 3523–3530.
- Choi, C., Kwon, D., Min, K. & Chae, C. (2001). Detection and localization of ApxI, -II and -III genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine pleuropneumonia by *in situ* hybridization. *Vet Pathol* 38, 390–395.
- Daines, D. A., Cohn, L. A., Coleman, H. N., Kim, K. S. & Smith, A. L. (2003). *Haemophilus influenzae* Rd KW20 has virulence properties. *J Med Microbiol* 52, 277–282.
- Del Rio, M. L., Gutierrez, C. B. & Rodriguez Ferri, E. F. (2003). Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol* 41, 880–882.
- Galdiero, M., De Martino, L., Pagnini, U., Pisciotto, M. G. & Galdiero, E. (2001). Interactions between bovine endothelial cells and *Pasteurella multocida*: association and invasion. *Res Microbiol* 152, 57–65.
- Goldstein, G. W. & Betz, A. L. (1986). The blood-brain barrier. *Sci Am* 255, 74–83.
- Gottschalk, M. & Taylor, D. J. (2005). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Diseases of Swine*, Edited by B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling & D. J. Taylor. Ames: Iowa State University (in press).
- Hill, C. E., Metcalf, D. S. & MacInnes, J. I. (2003). A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. *Vet Microbiol* 96, 189–202.
- Hippenstiel, S. & Suttrop, N. (2003). Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost* 89, 18–24.
- Huang, S. H. & Jong, A. Y. (2001). Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* 3, 277–287.
- Huang, S. H., Stins, M. F. & Kim, K. S. (2000). Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* 2, 1237–1244.
- Jacques, M., Belanger, M., Roy, G. & Foisy, B. (1991). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet Microbiol* 27, 133–143.
- Kielstein, P. & Rapp-Gabrielson, V. J. (1992). Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J Clin Microbiol* 30, 862–865.
- Kielstein, P., Rosner, H. & Muller, W. (1991). Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agargel precipitation and the dot-blot procedure. *Zentralbl Veterinarmed B* 38, 315–320.
- Kniesel, U. & Wolburg, H. (2000). Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20, 57–76.
- Lichtensteiger, C. A. & Vimr, E. R. (1997). Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol Lett* 152, 269–274.
- Moller, K. & Kilian, M. (1990). V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. *J Clin Microbiol* 28, 2711–2716.
- Morozumi, T. & Nicolet, J. (1986a). Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *J Clin Microbiol* 23, 1022–1025.
- Morozumi, T. & Nicolet, J. (1986b). Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J Clin Microbiol* 23, 138–142.
- Munch, S., Grund, S. & Kruger, M. (1992). Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*. *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 59–64.
- Oliveira, S. & Pijoan, C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol* 99, 1–12.
- Oliveira, S., Batista, L., Torremorell, M. & Pijoan, C. (2001). Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. *Can J Vet Res* 65, 161–167.
- Patrick, D., Betts, J., Frey, E. A., Prameya, R., Dorovini-Zis, K. & Finlay, B. B. (1992). *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. *J Infect Dis* 165, 865–872.
- Rafiee, M. & Blackall, P. J. (2000). Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J* 78, 172–174.
- Rapp-Gabrielson, V. J. & Gabrielson, D. A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am J Vet Res* 53, 659–664.
- Rapp-Gabrielson, V. J., Gabrielson, D. A. & Schamber, G. J. (1992). Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. *Am J Vet Res* 53, 987–994.
- Schaller, A., Kuhnert, P., de la Puente-Redondo, V. A., Nicolet, J. & Frey, J. (2000). Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet Microbiol* 74, 365–376.
- Segales, J., Domingo, M., Balasch, M., Solano, G. I. & Pijoan, C. (1998). Ultrastructural study of alveolar macrophages infected in vitro with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, with and without *Haemophilus parasuis*. *J Comp Pathol* 118, 231–243.
- St Geme, J. W., 3rd & Falkow, S. (1990). *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 58, 4036–4044.
- Tadjine, M., Mittal, K. R., Bourdon, S. & Gottschalk, M. (2004). Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *J Clin Microbiol* 42, 839–840.
- Teifel, M. & Friedl, P. (1996). Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res* 228, 50–57.
- Townsend, G. C. & Scheld, W. M. (1995). *In vitro* models of the blood-brain barrier to study bacterial meningitis. *Trends Microbiol* 3, 441–445.
- Tunkel, A. R., Rosser, S. W., Hansen, E. J. & Scheld, W. M. (1991). Blood-brain barrier alterations in bacterial meningitis: development of an *in vitro* model and observations on the effects of lipopolysaccharide. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A, 113–120.
- Tuomanen, E. (1996). Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev* 18, 289–299.
- Turni, C. & Blackall, P. J. (2005). Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol* 106, 145–151.
- Vahle, J. L., Haynes, J. S. & Andrews, J. J. (1997). Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Can J Vet Res* 61, 200–206.
- Vanier, G., Segura, M., Friedl, P., Lacouture, S. & Gottschalk, M. (2004). Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* 72, 1441–1449.
- Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D. J., Alexandrescu, C. & Moxon, E. R. (1991). Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb Pathog* 10, 231–245.
- Zucker, B. A., Baghian, A., Traux, R., O'Reilly, K. L. & Storz, J. (1996). Detection of strain-specific antigenic epitopes on the lipooligosaccharide of *Haemophilus parasuis* by use of monoclonal and polyclonal antibodies. *Am J Vet Res* 57, 63–67.